

Exhibit 1

JP 2004-500042 A 2004.1.8

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特許2004-500042

(P2004-500042A)

(53) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(58) Int. Cl.⁷

F1

C12N 15/09
A61K 35/74
A61K 38/00
A61K 38/43
A61K 45/00

C12N 15/00
A61K 35/74
A61K 45/00
A61K 48/00
A61P 35/00

ZNAA
A

テーマコード(略号)
4B024
4B065
4C084
4C087
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (金 200 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-528552(2001-528552)
(22) 出願日 平成12年8月24日(2000.8.24)
(53) 国際公開日 平成14年4月4日(2002.4.4)
(54) 国際出願番号 PCT/US2000/023242
(55) 国際公開番号 W02001/025397
(56) 国際公開日 平成13年4月12日(2001.4.12)
(31) 優先権主張番号 60/157,500
(32) 優先日 平成11年10月4日(1999.10.4)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/157,581
(32) 優先日 平成11年10月4日(1999.10.4)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/157,637
(32) 優先日 平成11年10月4日(1999.10.4)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 500115282
グアイオン ファーマシューティカルズ、
インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 06511 コネチカッ
ト州、ニューヘイブン、フォーサイエ
ンスパーク(特許なし)
(74) 代理人 100091096
弁理士 平本 祐昭
(74) 代理人 100118773
弁理士 勝田 節
(74) 代理人 100093183
弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 発明の名称 エフェクター分子の腫瘍学的選抜のための組成物および方法

(57) 要約

本出願は、固形腫瘍の部位に1つ以上の一次エフェクター分子を送達するための弱毒性腫瘍標的細菌(attenuated tumor-targeted bacteria)ベクターの作製ならびに使用を開示する。本発明の一次エフェクター分子は、癌腫、黑色素腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍病を治療するために本発明の方法において用いられる。本発明は、宿主に全身投与する場合に有害性でありうるエフェクター分子を、宿主への毒性を低下させた弱毒性腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達できるとする見解に基づく。本出願はまた、一次エフェクター分子と共に弱毒性腫瘍標的細菌によって送達され得る1つ以上の任意のエフェクター分子(二次エフェクター分子と呼ばれる)の送達を開示する。

本出願は、固形腫瘍の部位に1つ以上の一次エフェクター分子を送達するための弱毒性腫瘍標的細菌(attenuated tumor-targeted bacteria)ベクターの作製ならびに使用を開示する。本発明の一次エフェクター分子は、癌腫、黑色素腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍病を治療するために本発明の方法において用いられる。本発明は、宿主に全身投与する場合に有害性でありうるエフェクター分子を、宿主への毒性を低下させた弱毒性腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達できるとする見解に基づく。本出願はまた、一次エフェクター分子と共に弱毒性腫瘍標的細菌によって送達され得る1つ以上の任意のエフェクター分子(二次エフェクター分子と呼ばれる)の送達を開示する。

(2)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【特許請求の範囲】

【請求項1】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項2】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項3】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

19

【請求項4】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項3に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

20

【請求項5】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項6】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI I I、フィブロンクテンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロンクテン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項5に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

30

【請求項7】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項8】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プテリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはマイクロシンM15である、請求項7に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

40

【請求項9】

一次エフェクター分子が腫瘍阻害酵素である、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項10】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項9に記載の弱毒化腫瘍標的

59

(3)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

細菌。

【請求項 11】

一次エフェクター分子がヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 12】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 13】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。 10

【請求項 14】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 15】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項1に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 16】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子 (BRP) である、請求項2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 17】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌であって、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記弱毒化腫瘍標的細菌。 20

【請求項 18】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌であって、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 19】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項18に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。 30

【請求項 20】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項17または19に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 21】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ベネトキシシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項13または19に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 22】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項17、18または19に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。 40

【請求項 23】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項17、18または19に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 24】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項23に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 25】

50

(4)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒性腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物。

【請求項26】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒性腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物。

【請求項27】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項28】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEEK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項29】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項30】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端クンパク質分解断片、 α PA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaクンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaクンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β 、もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項29に記載の医薬組成物。

【請求項31】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項32】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリンA、コリンK、コリンL、コリンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プテリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピリオシン、またはマイクロシンM15である、請求項31に記載の医薬組成物。

【請求項33】

一次エフェクター分子が腫瘍阻害酵素である、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項34】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項35】

20

30

40

50

(5)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

少なくとも1つの一次エフェクター分子がヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項36】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項37】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項38】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項39】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項25に記載の医薬組成物。

【請求項40】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項41】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物であって、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記医薬組成物。

【請求項42】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物であって、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記医薬組成物。

【請求項43】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項42に記載の医薬組成物。

【請求項44】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項41または43に記載の医薬組成物。

【請求項45】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ペネトラキシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項42または43に記載の医薬組成物。

【請求項46】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項41、42または43に記載の医薬組成物。

【請求項47】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項41、42または43に記載の医薬組成物。

【請求項48】

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の一次エフェクター分子を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項49】

(6)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

固形腫瘍の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子を送達する方法であって、標的許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む遺伝性因子または遺伝性因子である腫瘍化腫瘍標的細胞と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項50】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項51】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITRLである、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項53】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI、II、フィブリンゲノリンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンチゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブリンゲノリン、プロウラゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β 、もしくはVEGF受容体のペプチドアンチゴニストである、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項48または49に記載の方法。

【請求項55】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、ブチリン7423、ピロシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピリオシン、またはミクロシンM15である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが腫瘍阻害酵素である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項57】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項59】

(7)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

一次エフェクター分子の少なくとも1つが動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項60】

二次エフェクター分子の少なくとも1つが抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項49に記載の方法。

【請求項61】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項62】

弱毒化腫瘍標的細菌が増殖された放出系をさらに含む、請求項48に記載の方法。

10

【請求項63】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項49に記載の方法。

【請求項64】

固形腫瘍の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク質を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項65】

20

固形腫瘍の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク質を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項66】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項64または66に記載の方法。

30

【請求項68】

フェリーペプチドが、HIV-TATタンパク質、アンテナペディアホモドメイン (ペネトラキシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項65または66に記載の方法。

【請求項69】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項64、65または66に記載の方法。

【請求項70】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項64、65または66に記載の方法。

40

【請求項71】

動物の固形腫瘍を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項72】

動物の固形腫瘍を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフ

50

(8)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項73】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項74】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトシス誘導物質 (TWEEK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項71または72に記載の方法。

【請求項76】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンII、フィブロネクチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7、8 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13、40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β 、もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項71または72に記載の方法。

【請求項78】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコックス1580、ブチリシン7423、ビオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ビプリオシン、またはマイクロシンM15である、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが腫瘍阻害酵素である、請求項71または72に記載の方法。

【請求項80】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項82】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項83】

(9)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項 71 または 72 に記載の方法。

【請求項 85】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 86】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 87】

動物の固形腫瘍を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む適性好気性菌または適性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項 88】

動物の固形腫瘍を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む適性好気性菌または適性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項 89】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

シグナル配列がOmp A様タンパク質である、請求項 87 または 89 に記載の方法。

【請求項 91】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ベネトラキシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項 88 または 89 に記載の方法。

【請求項 92】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項 87、88 または 89 に記載の方法。

【請求項 93】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項 87、88 または 89 に記載の方法。

【請求項 94】

動物の固形腫瘍を治療する方法であって、製薬上許容される担体と弱毒化腫瘍標的細菌とを含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる、上記方法。

【請求項 95】

Omp A 様タンパク質およびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

【請求項 96】

シグナル配列、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

【請求項 97】

シグナル配列がOmp A 様タンパク質である、請求項 96 に記載の融合タンパク質。

【請求項 98】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ベネトラキシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘル

(10)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ルベスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項96に記載の融合タンパク質。

【請求項99】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項95または96に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は1999年10月4日出願の米国仮特許出願60/157,500、60/157,581、及び60/157,637に対する優先権を主張し、それらの各々の内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、固形腫瘍を治療又は阻害するための、固形腫瘍への1種以上の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）の送達に関する。特に、本発明は、適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位に1種以上の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）を送達するためのベクターとしての弱毒化腫瘍標的細菌（attenuated tumor-targeted bacteria）、例えばサルモネラ（*Salmonella*）、の調製及び使用に関する。特に、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、1種以上の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）をコードするように改変されている通性好気性菌又は通性嫌気性菌である。本発明の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）には、TNFサイトカイン・ファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドが含まれる。本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫、又はこれらの腫瘍から誘導される転移物のような固形腫瘍癌の治療に有用である。本発明は、さらに、一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）、例えば、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドを、宿主に対する毒性及び免疫学的合併症を低下させた弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達できるという驚くべき発見に関する。また、本発明は、一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）と共に弱毒化腫瘍標的細菌によって送達することができる1種以上の任意のエフェクター分子（1種もしくは複数種）（「二次エフェクター分子」と呼ばれる）の送達にも関する。この二次エフェクター分子（1種もしくは複数種）はさらなる抗腫瘍治療活性を提供し、弱毒化腫瘍標的細菌からの一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）の放出を増強し、及び/又は適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位での一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）の取り込みを増強する。

【0003】

2. 発明の背景

新生物、すなわち腫瘍は異常な細胞の増殖の結果生じる新生物塊であり、良性又は悪性であり得る。良性腫瘍は、一般には、局在したままである。悪性腫瘍は、一般には、隣接組織に浸潤してそれを破壊する潜在能力を有し、離れた部位まで広がって死を引き起こす（レビューには、Robins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122 を参照）。腫瘍は、ある器官もしくは組織から別のものに広がったときに転移していると言われる。

【0004】

固形腫瘍の化学療法における主な問題は、同時に正常細胞に対する損傷を最小にしながら、腫瘍細胞を根絶するのに十分な濃度での治療作用物質、例えば、薬物の送達である。したがって、多くの研究室における研究は生物学的送達系、例えば、薬物を標的送達するための抗体、サイトカイン、及びウイルス、プロドラッグ変換酵素、及び/又は腫瘍細胞に入れる遺伝子の設計に向けられている（例えば、Crystal, R. G., 1995, Science 270:404-110 を参照）。

【0005】

2. 1. 細胞性免疫及びサイトカイン

癌を治療するための方策の1つは、細胞性免疫応答を増強又は活性化することを含む。自己腫瘍に向けられた細胞性免疫応答をうまく誘導することで従来の化学療法を上回る幾つかの利点が得られる：1) 免疫認識は高度に特異的であり、排他的に腫瘍に向かう；2) 免疫監視によって転移部位での増殖を抑制することができる；3) 免疫応答及び認識の多様性は腫瘍細胞によって用いられる異なる耐性機構を補償することができる；4) 細胞傷害性T細胞のクローン性増殖が増殖する腫瘍よりも迅速に起こり得、その結果として最終的に腫瘍を征圧する抗腫瘍機構が生じる；及び5) 記憶応答が、物理的な検出の前に、疾患の再発をその最初期段階で抑制することができる。応答を示す患者の臨床的研究は、成功する免疫療法が、CD4+T細胞、マクロファージ、及びNK細胞の関与について証拠が存在するものの、CD8+T細胞(クラスI応答)の活性化を含むことを示す動物モデルからの結果を支持している。例えば、Chapoval et al., 1998, J. Immunol. 161:6977-6984; Gollub et al., 1998, J. Clin. Invest. 102:561-575; Kikuchi et al., 1999, Int. J. Cancer 80:425-430; Pan et al., 1995, Int. J. Cancer 80:425-430; Saffran et al., 1998, Cancer Gene Ther. 5:321-330; 及び Zimmermann et al., 1999, Eur. J. Immunol. 29:284-290を参照のこと。

[0006]

2. 2. サイトカインの腫瘍壊死因子(TNF)ファミリー

TNFファミリーの最も特徴付けられたメンバーはTNF- α である。TNF- α は免疫系に対して多面的な効果を発揮することが知られている。TNF- α は腫瘍細胞に対して強力な細胞傷害性効果と直接発癌することができると示唆されている。TNF- α は、一般には、他の機構、例えば、増殖及び分化の刺激、並びに単球におけるアポトーシスの防止(例えば、Mangan et al., 1991, J. Immunol. 146:1541-1546; 及び Ostensen et al., 1987, J. Immunol. 138:4185-4191を参照)、最終的には腫瘍内での血餅形成につながる、組織因子様凝血原活性の促進及び内皮細胞表面抗凝血原活性の抑制(Beutler and Cerami, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:625-655; 及び Vassalli, P., 1992, Ann. Rev. Immunol. 10:411-452においてレビューされている)。しかしながら、これらの特性の結果として、汎発性血管内凝血のため、TNF- α の全身投与は宿主に致命的な結果を生じる。

[0007]

他のサイトカインも抗腫瘍応答に関連付けられている。IL-2はクラスIサイトカインであり、やはり抗腫瘍応答において役割を果たすものと考えられている。例えば、自発的に進行する黒色腫はTNF- α 及びIL-2の腫瘍内レベルの上昇に関連付けられている。例えば、Beutler and Cerami, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:625-655; Lowes et al., 1997, J. Invest. Dermatol. 108:914-919; Mangan et al., 1991, J. Immunol. 146:1541-1546; Scheruich et al., 1987, J. Immunol. 138:1786-1790を参照のこと。

[0008]

TNF- α 及びIL-2の両者はリンパ球の帰巢(homing)を助け、IL-2はナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、及びリンホキシン活性化キラー(LAK)細胞の腫瘍浸潤を誘発することが示されている(例えば、Etter et al., 1998, Cytokine 10:395-403; Reinhardt et al., 1997, Blood 89:3837-46; Chen et al., 1997, J.

(12)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Neuropathol. Exp. Neurol. 56:541-50;Vora et al., 1996, Clin. Exp. Immunol. 105:155-62;Luscinskase et al., 1996, J. Immunol. 157:326-35;Kjaergaard et al., 1998, Scand. J. Immunol. 47, 532-540;Johansson et al., 1996, Nat. Immun. 15:87-97;及びWatanabe et al., 1997, Am. J. Pathol. 150:1869-80を参照)。TNF- α 及びIL-2の両者の存在下においては、TNF非感受性細胞株に向けられたときでさえ、NK及びLAK細胞の細胞溶解活性が増加する(例えば、Ostensen et al., 1987, J. Immunol. 138:4185-4191を参照)。しかしながら、IL-2の治療用レベルは宿主に対して毒性であることも示されている。

【0009】

明らかに、全身サイトカイン投与に起因する用量制限性の毒性は適治療におけるサイトカインの潜在能力の実現に重大な障壁を突きつける。さらに、全身性のサイトカイン送達とは、望ましくない臨床的副作用に加えて、同系T細胞の増殖の減少を生じ、したがって、標的免疫治療に対立することがある。Addison et al., 1998, Gene Ther. 5:1400-1409;Albertini et al., 1997, Clin. Cancer Res. 3:1277-1288;Becker et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7826-7831;Book et al., 1998, J. Neuroimmunol. 92:50-59;Cao et al., 1998, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 124:88-92;D'Angelica et al., 1999, Cancer Immunol. Immunother. 47:265-271;Deszo et al., 1996, Clin. Cancer Res. 2:1543-1552;Kjaergaard et al., 1998, Scand. J. Immunol. 47:532-540;Ostensen et al., 1987, J. Immunol. 138:4185-4191;及びSchirmacher et al., 1998, Clin. Cancer Res. 4:2635-2645を参照のこと。

【0010】

2. 3. サイトカインの送達

近年の実験的動物及び臨床研究では、サイトカインの亜全身性(sub-systemic)又は代替送達方法により、サイトカインの全身毒性を回避し、かつより高用量を投与する試みがなされている。ネズミモデルにおいては、膜融合リポソーム封入TNF- α 遺伝子の投与、及び短腸尿管構造に局在し得るポリエチレングリコール封入TNF- α の全身投与で肉腫-180腫瘍が治療されている(Tsutsumi et al., 1996, Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085を参照)。肉皮単球活性化ポリペプチドによるTNF- α に対する腫瘍の感作も報告されている(Marvin et al., 1999, J. Surg. Res. 63:248-255;Wu et al., 1996, Cancer Res. 59:205-212)。

【0011】

臨床研究において、インターフェロン- α 又はメルファランと組み合わせた隔離肢灌流(isolated limb perfusion)による患者への高用量TNF- α の投与の後、完全な腫瘍の根絶が観察されている。しかしながら、この技術は、治療の後にサイトカインが完全に除去されない場合、患者に重大な危険をもたらす。さらに、これらの治療は肢隔離を必要とし、これはそれ自身が患者に危険をもたらす。Eggermont et al., 1997, Semin. Oncol. 24:547-555;Frazer et al., 1995, Cancer J. Sci. Am. 1:122-130;Lejeune et al., 1998, Curr. Opin. Immunol. 10:573-580;Marvin et al., 1996, J. Surg.

(13)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Res. 63:248-255; Mizuguchi et al., 1998, Cancer Res. 58:5725-5730; Tsutsumi et al., 1996, Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085; 及び Wu et al., 1996, Cancer Res. 59, 205-212 を参照のこと。

[0012]

Carrier et al., 1992, J. Immunol. 148:1176-81; Saltzman et al., 1997, Cancer Biother. Radiopharm. 12:37-45; Saltzman et al., 1997, J. Pediatr. Surg. 32:301-306 による従来の研究では、IL-1 β (Carrier) 及び IL-2 (Saltzman) を自然のサルモネラ感染部位である肝臓及び脾臓に直接送達させてワクチン株としての役割を課すか、又は肝臓に移転に影響を及ぼすのに弱毒性サルモネラ株の使用が報告されている。Saltzman の研究ではサルモネラの経口投与が用いられ、ここでは細菌は GALT (腸随伴リンパ組織 (gut associated lymphoid tissue)) によって取り込まれ、肝臓及び脾臓に輸送される。しかしながら、これらの感染は自然の感染部位に限定される。

[0013]

2. 4. 血管新生及び腫瘍形成

癌を治療するための別の方策は血管新生の阻害を含む。血管新生は既存の血管からの新規毛細血管の増殖のプロセスである。新規毛細血管は、既存血管の内皮細胞が、マトリックス・メタロプロテアーゼのようなタンパク分解酵素を用いて、それらの近傍の基底膜を分解し、増殖させ、周囲間質組織内に移動させ、微細管を形成するプロセスによって形成される。この血管新生のプロセスは負及び正の因子の相互作用によって非常に厳密に調節されており、成人においては、通常女性の生殖周期及び創傷の修復に限定される (Malone et al., 1999, Clin. Exp. Metastasis 17:1-14)。血管新生の異常調節が、糖尿病性網膜症、乾癆、関節リウマチ、心血管病、及び腫瘍形成を含む多くのヒト障害に関連付けられている (Folkman, 1995, Nat. Med. 1:27-31)。

[0014]

血管新生は腫瘍の成長及び転移にとって最も重要なプロセスである。腫瘍の形成は2つの段階、前血管及び血管段階に分けられる。前血管腫瘍の細胞が血管新生化腫瘍に由来する細胞と同程度に迅速に増殖することが研究によって示されている。しかしながら、前血管腫瘍が2-3mm³を上回るまで増殖することはほとんどなく、これは細胞増殖と細胞死との間に平衡が存在するためであり、後者は前血管腫瘍の低酸素性から生じるものである (Folkman, 1995, Nat. Med. 1:27-31)。前血管から血管段階への切り替えには、負の因子が優勢である正味のバランスから正の因子、例えば、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 及び血管内皮増殖因子 (VEGF) が優位であるものへの血管新生の調節因子のバランスの移動を必要とする (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176)。調節因子間のバランスの移動は血管新生因子の上方調節とそれと同時の抗血管新生因子の下方調節の結果である (Folkman, 1995, N. Eng. J. Med. 333:1757-1763)。

[0015]

2. 5. 抗血管新生因子

原発腫瘍がそれらの転移物の増殖をしばしば阻害する結果につながる幾つかの関連する現象に基づいて、抗血管新生因子が存在するものと仮定された (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176)。畢竟されるべきこれらの因子のうちの第1のものはマウス・アンギオスタチン、原発 Lewis 肺癌腫瘍によって循環中に放出され、二次転移物の増殖を防止するプラスミノーゲンの 38 kDa タンパク分解性断片であった (O'Reilly et al., 1994, Cell 79

179:315-328)。ヒトにおいては、メクロエラストアーゼでのプラスミノーゲンの制限タンパク分解によって産生される40、42及び45kDaのペプチドがマウス・アンギオスタチンに匹敵する抗血管新生活性を有する(O'Reilly et al., 1994, Cell 79:315-328)。プラスミノーゲンそれ自体はそのような活性を持たない。腫瘍細胞それ自体は検出可能なアンギオスタチンmRNAを持たないため、腫瘍関連マクロファージがアンギオスタチンの産生の原因であることも考えられる。マクロファージのメクロエラストアーゼの発現は、腫瘍細胞によって分泌される顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)によって誘導される(Dong et al., 1997, Cell 83:801-810)。特定の腫瘍においては、アンギオスタチン産生はメクロエラストアーゼではなくセリンプロテアーゼによって触媒され、セリンプロテアーゼは腫瘍細胞によって直接産生される(Gately et al., 1997, Cancer Res. 56:4887-4890)。原発腫瘍を有する実験マウスにアンギオスタチンを100mg/kg/日の濃度で投与することで、毒性副作用なしに腫瘍増殖の強力な阻害が生じた。このアンギオスタチン処置の中止の2週間以内に腫瘍が再増殖し、この処置の結果として腫瘍は完全に死ぬのではなく休眠状態に退行することが示される(O'Reilly et al., 1996, Nat. Med. 2:689-692)。

[0016]
アンギオスタチンの発見後、幾つかの血管新生阻害性ペプチドを含む他の血管新生阻害物質が発見され、単離された。アンギオスタチンよりも強力な血管新生の阻害物質はクリン6(kringle 5)、プラスミノーゲンの第5クリングル・ドメインを含むペプチドである(アンギオスタチンはクリングル・ドメイン1-4を含む)。クリングル5はプラスミノーゲンのタンパク分解によって産生することができ、組換え形態も活性である(Cao et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:22924-22928)。

[0017]
エンドスタチンはアンギオスタチンの単離に類似する方法で単離され(O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20)、その源はLewis肺癌腫ではなくネズミ血管内皮腫であった。このペプチドは20kDaの見かけの分子量を有し、その配列はコラーゲンXVIII、様々なコラーゲン分子の間で開散しているNC1と呼ばれる領域(Oh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4229-4233;及びRehnet et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4234-4238)のC末端に相当する(O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20)。マウスにおいて、Lewis肺癌腫転移物の増殖が0.3mg/kg/日の組換えエンドスタチンを投与することによって抑制され、このペプチドを20mg/kg/日で投与したときには原発腫瘍が休眠状態に退行する。機能的組換えエンドスタチンは封入体から、in vitroでの変性及び再折り畳みにより、又はin vivoでの皮下投与されたエンドスタチン封入体製剤の持続性放出により、産生させることができる(O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20)。エンドスタチン発現プラスミドを筋肉内投与することからなるエンドスタチン送達の方法は、マウスモデル系において、腫瘍増殖の部分的阻害のみを生じる(Bleisinger et al., 1999, Nat. Biotech. 17:343-348)。同様に、静脈内送達された、リボソームに複合体化されたエンドスタチン又はアンギオテンシン・エンコーディングプラスミドは、乳癌のヌードマウスモデルにおいて、腫瘍増殖の部分的阻害を生じた(Chen et al., 1999, Cancer Res. 59:3308-3312)。

[0018]
近年、新規抗血管新生活性がSerpin(セリンプロテアーゼ阻害物質)抗トロンビンのC末端切断ペプチドに帰されている(O'Reilly et al., 1999, S

ciences 285:1926-1925)。完全長抗トロンピンには固有の抗血管新生活性はないが、トロンピンによるそのタンパク質のC末端反応性ループの開裂により、抗トロンピンは強力な血管新生活性を獲得する。以下、このタンパク分解断片を抗血管新生性抗トロンピンと呼ぶ。

[0019]

当該技術分野において公知の値の血管新生阻害性ペプチドにはフィブロネクチンの29 kDa N末端及び40 kDa C末端タンパク分解断片 (Homandberg et al., 1985, J. Am. Pathol. 120:327-332); プロラクチンの16 kDaタンパク分解断片 (Clapp et al., 1993, Endocrinology 133:1292-1299); 及び血小板第4因子の7.8 kDaタンパク分解断片 (Gupta et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7799-7803) が含まれる。

[0020]

抗血管新生効果が示されている天然産生タンパク分解断片に加えて、公知の細胞外マトリックスタンパク質の領域に相当する幾つかの合成ペプチドが血管新生の阻害における活性について評価されている。機械的内皮阻害性物質、すなわち、血管新生阻害物質であることが示されている合成ペプチドには、血小板第4因子の断片に相当する13アミノ酸ペプチド (Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083); コラーゲンIの断片に相当する14アミノ酸ペプチド (Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511); トロンボスポンジンIの断片に相当する19アミノ酸ペプチド (Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511); 及び、ヒト黒色腫細胞における発現が *in vitro* での細胞浸潤の減少及び *in vivo* ノードマウスモデルにおける腫瘍形成能の減少につながる分泌性のシステインに富む細胞外マトリックス糖タンパク質である (Ledda et al., 1996, Nature Med. 3:171-176) SPARCの断片に相当する20アミノ酸ペプチド (Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334) が含まれる。

[0021]

血管新生を阻害し、かつラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲン、及びEGFの断片に相当する10アミノ酸未満の他のペプチドも記載されている (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176 による説を参照)。

[0022]

血管新生を阻害する小フィブロネクチンペプチドは、一般に、モチーフRGDを含む。RGDはインテグリン分子の認識とそれに結合するためにタンパク質によって用いられるペプチドモチーフ (アミノ酸Arg-Gly-Asp) である。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現は血管新生性血管に関連し、モノクローナル抗体によるその活性の阻害は血管新生を遮断する (Brooks et al., 1994, Science 264:569-571)。これは、RGDモチーフを含む環状ペプチドの投与がフィブロネクチン受容体型インテグリンの活性を阻害し、網膜の血管新生を遮断することを示す研究によって確認されている (Hammes et al., 1996, Nature Medicine 2:529-533)。インテグリン・ブロッカー、例えば、環状ペプチド及びモノクローナル抗体の抗血管新生効果は、血管新生性血管のアポトーシスを誘導することにより腫瘍の進行を促進することが示されている (Brooks et al., 1994, Cell 79:1157-1164)。RGDモチーフ、及び他のインテグリン結合性モチーフNGR (アミノ酸Asn-Gln-Arg) を含むペプチドは顕著に強化された抗腫瘍活性を示した。

[0023]

別のタイプの細胞表面受容体、すなわち、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター

(15)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

(uPA) 受容体の活性の阻害も血管新生の阻害を生じる。uPA 受容体は、リガンドの結合により、血管新生の基底膜浸潤工程に必要なタンパク分解カスケードを開始する。受容体アンタゴニストによる uPA 受容体の阻害は血管新生、腫瘍増殖 (Min, et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433) 及び転移 (Crowley et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5021-5025) を阻害する。そのようなアンタゴニストは無作為ペプチドのバクテリオファージ・ペプチド表示によって同定されている (Goodson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7129-7133)。受容体のリガンド、uPA の陽性ネガティブ形態も同定されている (Min et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433)。

[0024]

アンギオスタチン、エンドスタチン及び他の抗血管新生ペプチドの発見は癌治療の刺激的な新規アプローチをもたらしたものの、これらのペプチドを 1 つ以上を含む治療課程の実験は、ペプチドの大量産生の非現実性 (65 kg、すなわち 143 lb の平均的な人物について、ペプチドによっては毎日約 1.3 又は 6.5 グラムのタンパク質を生成するコスト及び/又は努力から生じる) 及び治療の持続期間 (腫瘍を退行状態に留めるには持続しなければならない) である。これらのペプチドをそのように多量に投与しなければならない 2 つの主な理由は、第 1 に、大部分が血流中で分解し、第 2 に、分解を免れた分子のうち、非常に限定された部分のみが腫瘍まで到達する。したがって、抗血管新生タンパク質又はペプチドをより効率的に腫瘍部に、かつより対費用効果が高くして患者に優しい方法で送達することができれば、腫瘍治療の分野にとって非常に利点がある。

[0025]

2. 6. バクテリオシン・ファミリー

コリン E3 (以下、ColE3 と呼ぶ) はバクテリオシン、すなわち、選択的活性を有するバクテリアタンパク質性毒素であり、その宿主はその毒素に対して免疫される。バクテリオシンは宿主ゲノム又はプラスミドによってコードされ得、広範な、もしくは狭い範囲の宿主を有することができ、かつ 1 つもしくは 2 つのサブユニットを含む単純構造又は多サブユニット構造を有することができる (Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144)。加えて、バクテリオシン宿主はバクテリオシンに対する免疫を有する。この免疫は、バクテリオシンを免認しないとしても、所定の宿主集団の全ての細胞において見いだされる。

[0026]

ColE3 の細胞傷害性はそのタンパク質合成の阻害から生じる (Nomura, 1963, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:315-324)。ColE3 活性の標的は細菌リボソームの 16S 成分 (これは、30S 及び 70S リボソームに共通である) であり (Bowman et al., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68:964-968)、その活性はリボソームの分解を生じる (Meyhack, 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。ColE3 の活性は RNA 分解酵素のうちで独特であり、RNA の全体的な分解は生じないが、mRNA 分子を末端から 49 スクロチドで断裂し、mRNA からの tRNA の分離と、それによる翻訳の阻害を生じる。ColE3 のリボスクレアーゼ活性は、他のタンパク質が介在するのではなく、その分子それ自体にある (Saunders, 1978, Nature 274:113-114)。

[0027]

その天然形態において、ColE3 は 1:1 比の 50 kDa 及び 10 kDa タンパク質からなる 60 kDa タンパク質複合体であり、大きいサブユニットはスクレアーゼ活性を有し、小さいサブユニットは 50 kDa サブユニットの阻害機能を有する。したがって、50 kDa タンパク質は細胞傷害性タンパク質 (すなわち、毒素) として作用し、10 kDa タンパク質は抗毒素として作用する。50 kDa サブユニットは少なくとも 2 つの機能

(17)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

的ドメイン、標的細胞膜を横切つての転位に必要なN末端領域、及び触媒（RNA分解酵素）活性を有するC末端領域を含む。宿主生物内で、大サブユニットの活性は小サブユニットによって阻害される。これらのサブユニットは、その毒素が標的細胞内に侵入したときに、標的細胞の外膜との相互作用の結果として解離するものと考えられる（Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144による総説）。

【0028】

ColE3の大サブユニットの毒性は微生物のうちのクローン化遺伝子の外側拡散の防止に利用されている。Diazら（1994, Mol. Microbiol. 13: 855-861）は、ColE3のこれら2つの成分を、小（抗毒性）サブユニットが染色体に統合されたコーティング配列として発現し、大サブユニットがプラスミドから発現されるように分離した。染色体に組み込まれた小サブユニットを有する細菌はColE3大サブユニットを発現するプラスミドに対して免疫されているが、そのプラスミドが小サブユニットを欠く別のレシビエントに向けて外部に搬送された場合、その細胞は殺される。

【0029】

コリシンE3（ColE3）は、白血病細胞モデル系（Fiska et al., 1979, Experimentia 35:406-407を参照）を含む哺乳動物細胞に対する大きな細胞傷害性効果を示すことも示されている（Smarda, et al., 1978, Folia Microbiol. 23:272-277を参照）。ColE3の活性は80S哺乳動物リボソームの40Sサブユニットを標的とする（Tumowsky et al., 1973, Biochem. Biophys. Res. Commun. 52:327-334）。

【0030】

2. 7. 細菌の感染及び癌

初期の臨床観察で、細菌が感染した患者においてある種の癌が進行することが報告された症例が報告された。Nauts et al., 1953, Acta Medica Scandinavica 145:1-102, (Suppl. 276);及びShear, 1950, J. A. M. A. 142:383-390を参照のこと。これらの観察以来、Lee et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1847-1851 (Leeら)及びJones et al., 1992, Infect. Immun. 60:2475-2480 (Jonesら)は、in vitroで野生型株よりもかなり多くの数がHEp-2（ヒト頸表皮癌）細胞に浸潤し得るサルモネラ菌（Salmonella typhimurium）の突然変異体を単離した。これらの「過剰浸潤性（hyperinvasive）」突然変異体は、HEp-2動物細胞に浸潤する野生型株の能力を通常は抑制する細菌の好気性増殖の条件下で単離した。しかしながら、Leeら及びJonesらによって記載されるような過剰浸潤性サルモネラ菌には汎浸潤性（pan-invasive）感染の危険性があり、患者者に広範に広がる細菌感染につながる可能性がある。

【0031】

Carswell et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3666-3669は、ウシ型弱毒結核菌ワクチン（bacillus Calmette-Guerin）（BCG）を注射したマウスでTNFの血清濃度が増加し、TNF陽性血清がマウスにおいて肉腫Meth A及び他の移植腫瘍の壊死を生じたことを示した。このような観察の結果として、BCG注射での癌患者の免疫化が現在幾つかの癌治療プロトコルにおいて用いられている。BCG治療のレビューには、Snowski, 1994, Compr. Ther. 20:695-701;Barth and Morton, 1995, Cancer 75 (Suppl. 2): 726-734;Friberg, 1993, Med. Oncol. Tumor Pharmacother. 10:31-36を参照のこと。

【0032】

しかしながら、TNF- α 介在敗血症性ショックが細菌に関連する主な懸念のうちにあり、宿主にとって毒性もしくは致命的な結果を有する可能性がある (Bone, 1992, JAMA 268:3452-3455; Dinarello et al., 1993, JAMA 269:1829-1835)。さらに、TNF- α の用量制限性の全身毒性は有効な臨床使用の主要な障壁であった。TNF- α のレベルが毒性ではなく、治療ベクターのより有効な濃度及び/又は持続期間を用いることができれば、この形態の免疫応答を低下させる改変は有用であろう。

【0033】

2. 8. 腫瘍標的細菌

遺伝子操作されたサルモネラが、腫瘍を標的とすることが可能であり、抗腫瘍活性を有し、かつ固形腫瘍へのエフェクター遺伝子、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSV TK) の送達において有用であることが示されている (Pawelek et al., WO 96/40238)。

【0034】

2. 9. 改変細菌リビドAによるTNF- α の誘導の減少

TNF- α 産生の誘導が減少する結果として免疫応答を変化させる腫瘍標的細菌の脂質組成を改変することがPawelekら (Pawelek et al., WO 96/40238) によって示唆された。Pawelekらは、モノホスホリリビドA (MLA) 産生の質を負うロードバクター (Rhodobacter) から遺伝子を単離するための方法を提供した。MLAは敗血症性ショックのアンタゴニストとして作用する。また、Pawelekらは、リビドA生合成における第3酵素UDP-3-O (R-30ヒドロキシルミリスチル) - グルコサミン-アシルトランスフェラーゼをコードする突然変異 *firA* (Kelley et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:19866-19874) を含む、リビドA生合成経路における遺伝子の改変の使用を提案した。Pawelekらは、*firA* 遺伝子における突然変異が低レベルのTNF α を誘導することを示した。

【0035】

大腸菌 (*Escherichia coli*) において、リビドAの末端ミリスチル化の原因である遺伝子 *msbB* (*mlt*) が同定されている (Engel, et al., 1992, J. Bacteriol. 174:6394-6403; Karow and Georgopoulos 1992, J. Bacteriol. 174:702-710; Somerville et al., 1996, J. Clin. Invest. 97:359-365)。この遺伝子の遺伝子の破壊は安定な無条件の突然変異を生じ、これはTNF α の誘導を低下させる (Somerville et al., 1996, J. Clin. Invest. 97:359-365; Somerville, WO 97/25061)。しかしながら、これらの参考文献は、腫瘍標的サルモネラベクターにおける *msbB* 遺伝子の破壊が、病原性が低く、かつキレート剤に対してより感受性である細菌を生じるであろうことを示唆してはいない。

【0036】

細菌を遺伝子送達ベクターとして用いることに関連する問題は、正常哺乳動物細胞を直接殺す細菌の一般的な能力に加えて、宿主にとって毒性の結果を有するTNF α を介して免疫系を過剰刺激するそれらの能力に集中している (Bone, 1992, JAMA 268:3452-3455; 及びDinarello et al., 1993, JAMA 269:1829-1835)。これらの要素に加えて、抗生物質に対する耐性は、ヒト体内での細菌の存在との対処を非常に複雑にする可能性がある (Tschape, 1996, D T W Dtsch Tierarztl Wochenschr 1996 103:273-7; Ramos et al., 1996, Enferm Infec Microbiol. Clin. 14:345-51)。

【0037】

(19)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Hone and Powell, WO 97/18837 (「Hone及びPowell」)は、非発熱性リビFA又はLPSを有するグラム陰性細菌を産生する方法を開示している。

[0038]

Maskell, WO 98/33923は、TNF α を野生型株と比較して低レベルで誘導するmsbB遺伝子内の突然変異を有するサルモネラの突然変異株を記載している。

[0039]

Bermudesら, WO 99/13053は、サルモネラにおけるmsbB遺伝子を遺伝的に破壊するための組成物及び方法を教示し、これは、野生型と比較してTNF α を誘導する能力に劣り、かつ病原性が低いサルモネラを生じる。ある種の態様においては、いくつかのそのような突然変異体サルモネラは野生型サルモネラと比較してキレート剤に対する感受性を高めた。Low et al., 1999, Nature Biotech 17:37-47も参照のこと。

[0040]

セクション2又は本願のあらゆるセクションにおけるあらゆる参考文献の引用又は同定は、そのような参考文献が本発明に対する従来技術として利用可能であることを承認するものであると解釈されるべきではない。

[0041]

3. 発明の概要

本発明は、固形腫瘍に1つ以上の一次エフェクター分子を送達する方法を提供する。一つの実施形態において、この方法は高レベルの1つ以上の一次エフェクター分子の送達を提供する。特に、本発明は、宿主に全身投与した場合には毒性であるか望ましくない作用（例えば、望ましくない免疫作用）を誘導する一次エフェクター分子を、宿主への毒性を低下させたサルモネラ（Salmonella）のような弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達する方法を提供する。本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合により1つ以上の二次エフェクター分子を、適当な作用部位（例えば、固形腫瘍部位）に送達するためのベクターとしての弱毒化腫瘍標的細菌（例えば、サルモネラ）の作製ならびに使用を包含する。詳細には、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合により1つ以上の二次エフェクター分子をコードするように遺伝子操作された通性好気性菌または通性嫌気性菌である。

[0042]

本発明は、固形腫瘍の部位で一次エフェクター分子をコードする核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は1つの一次エフェクター分子をコードする核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態に従うと、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態においては、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が同一の種のものである。この実施形態の別の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が異なる種（例えば、リステリア属とサルモネラ属）のものである。

[0043]

本発明の一次エフェクター分子は癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍を治療するのに有用である。本明細書中で用いる「固形腫瘍の治療」または「固形腫瘍を治療する」とは、腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害すること、腫瘍の体積を縮小すること、腫瘍細胞を殺すこと、または腫瘍細胞の広がり（転移）を防止することを包含する。特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍部位で局所免疫応答を引き出して、結果的に腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害し、腫瘍細胞を死滅させ、または腫瘍細胞の他の身体部分への転移を防止する。したがって、一次エフェクター分子は腫瘍治療効

(20)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

果をもたらす。

【0044】

一次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルスを含むがこれらに限らない、あらゆる既知の生物から誘導することができる。本発明の一実施形態の好ましい様式において、一次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。この実施形態のより好ましい様式では、一次エフェクター分子はヒト由来のものである。本発明の一次エフェクター分子としては、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチド、腫瘍阻害酵素、およびこれらの機能的断片が挙げられる。

【0045】

特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバーまたはその機能的断片である。TNFファミリーのメンバーの例として、制限するものではないが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α (リンホトキシン α)、LT- β (リンホトキシン β)、OX40L (OX40リガンド)、FasL、CD27L (CD27リガンド)、CD30L (CD30リガンド)、4-1BBL、APRIL (増殖誘導性リガンド)、LIGHT (活性化T細胞により産生される29kDaタイプI膜貫通タンパク質)、TL1 (腫瘍壊死因子様サイトカイン)、TNFSF16、TNFSF17、およびAITR-1 (活性化により誘導されるTNFRファミリーのメンバーのリガンド)がある。好ましい実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、およびCD40リガンド (CD40L)、またはこれらの機能的断片である。

【0046】

別の特定の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は抗血管新生因子またはその機能的断片である。抗血管新生因子の例として、制限するものではないが、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンIII、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.4kDaと称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならびにインテグリン α 、 β 、およびVEGF受容体のペプチドアンタゴニストがある。本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチン、アボミグレンまたはトロンボスポンジンIの機能的断片である。

【0047】

別の特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチド、またはその機能的断片である。細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドの例として、制限するものではないが、バクテリオシンファミリーのメンバー、ペロ毒素、細胞傷害性壊死因子1 (CNF1)、細胞傷害性壊死因子2 (CNF2)、Pasteurella multocida毒素 (PMT)、Pseudomonas内毒素、ヘモリシン、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害剤であるCAAXペプチド、サイクリン阻害剤、Rafキナーゼ阻害剤、CDCキナーゼ阻害剤、カスパーゼ3、p53、p16およびp21がある。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子はバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、バクテリオシンファミリーのメンバーはバクテリオシン放出タンパク質 (BRP) ではない。バクテリオシンファ

(21)

JP 2004-500642 A 2004.1.8

ミリーのメンバーの例として、制限するものではないが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシス1580、プテリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシナE216、およびピリオシンがある。特定の実施形態において、一次エフェクター分子はコリシンE3である。

【0048】
別の特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍阻害剤またはその機能性断片である。腫瘍阻害剤の例として、制限するものではないが、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼ (c o 10
1E3を除く)、DNAアーゼ、およびグリコシダーゼがある。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子はメチオナーゼである。

【0049】
本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌 (例えば、サルモネラ) により固形腫瘍に1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子を局所組合せ送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は1つの一次エフェクター分子と1つの二次エフェクター分子をコードする1つの核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態に倣うと、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態においては、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が異なる種 (例えば、リステリア属とサルモネラ属) のものである。

【0050】
本発明の二次エフェクター分子は、追加の抗腫瘍治療活性をもたらす、弱毒化一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により送達されて標的細菌からの一次エフェクター分子の放出を促進し、そして/また、作用部位 (例えば、固形腫瘍の部位) での内在化を高める。本発明の二次エフェクター分子は、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍を治療するために、一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により送達される分子 (例えば、細胞毒素、酵素、バクテリオシンを含むがこれに限定しない抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、抗原など) からなる。

【0051】
二次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生動物、ウイルスを含むがこれらに限定しない、あらゆる既知の生物から誘導することができる。特定の実施形態において、二次エフェクター分子は細菌またはウイルスに由来するものである。本発明のいくつかの好ましい実施形態では、二次エフェクター分子は細菌由来のもの (例えば、BRP) である。本発明の他の好ましい実施形態では、二次エフェクター分子はウイルス由来のもの (例えば、TAT) である。本発明のさらに他の好ましい実施形態では、二次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。いくつかの好ましい実施形態において、二次エフェクター分子はヒト由来である。

【0052】
本発明は、プラスミドまたはトランスフェクトした核酸によりコードされるエフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラである。2つ以上のエフェクター分子 (例えば、一次または二次) が弱毒化腫瘍標的細菌 (例えば、サルモネラ) において発現される場合、それらのエフェクター分子は同一のプラスミドまたは核酸によりコードされても、2つ以上のプラ 59

スミドまたは核酸によりコードされてもよい。本発明はまた、細菌ゲノムに組み込まれる核酸によりコードされるエフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。組み込まれるエフェクター分子は、弱毒化腫瘍標的細菌（例えば、サルモネラ）に対して内因性であってもよいし、また、（例えば、プラスミド、トランスフェクトしうる核酸、トランスポゾンのような、エフェクター分子をコードする核酸の導入により）弱毒化腫瘍標的細菌に導入されてもよい。結果的に、エフェクター分子をコードする核酸が弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれるようにする。本発明は、適切なプロモーターに機能的に連結されたエフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。エフェクター分子をコードする核酸に機能的に連結されるプロモーターは、同種（すなわち、天然）であっても異種（すなわち、エフェクター分子をコードする核酸本来のものではない）であってもよい。適当なプロモーターの例としては、制限するものではないが、*Tet*プロモーター、*lrc*、*pepT*、*lac*、*sulA*、*pol II* (*dinA*)、*rav*、*recA*、*uvrB*、*uvrD*、*umuDC*、*lexA*、*cea*、*caa*、*recN*、および *pagC* が挙げられる。

[0053]

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌によりシグナル配列とエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、Omp様タンパク質またはその一部（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、複数回膜貫通ドメイン、またはそれらの組合せ；「Omp様タンパク質」の定義については下記の第3、1節を参照のこと）およびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。作用機構に関して制限されるものではないが、本発明は、Omp様タンパク質が外膜にエフェクター分子を固定もしくはつなぎ止める働きをしているか、細菌外膜にエフェクター分子を局在させるように働く、と考えられる。いくつかの実施形態において、エフェクター分子は細菌外膜への送達が増加される。ある実施形態では、Omp様タンパク質にエフェクター分子を融合させることで、エフェクター分子の周辺細胞質への局在が増加される。Omp様タンパク質の例として、制限するものではないが、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ホーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、lamB、 β -ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン関連リポタンパク質（PAL）、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、および主要外膜リポタンパク質（例えば、LPS）のそれぞれの少なくとも一部が挙げられる。本発明の他の実施形態では、本発明の融合タンパク質はタンパク質分解切断部位を含む。このタンパク質分解切断部位はエフェクター分子またはOmp様タンパク質に内因性のものであってよく、あるいはタンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。

[0054]

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。融合タンパク質中を用いるフェリーペプチドは、その生産または導入の拡散範囲内のほぼすべての細胞への目的のポリペプチドまたはペプチドの送達を促進することが分かっている（例えば、Bayley, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 1066-1067; Fernandezら, 1998, *Nature Biotechnology* 16: 418-420; Derossiら, 1998, *Trends Cell Biol.* 8: 84-87を参照のこと）。したがって、フェリーペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現するように弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作することは、腫瘍細胞に内在化されるエフェクター分子の能力を高める。特定の形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つの融合タンパク質をコードする1つの核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。

(23)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

これらの実施形態によれば、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。フェリーペプチドの例として、制限するものではないが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアンホモドメイン（ペネトラキシン）、カボジ繊維芽細胞増殖因子（FGF）膜移行性配列（MTS）、および単純ヘルペスウイルスVP22がある。

【0055】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にシグナル配列とフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列とフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。

【0056】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にシグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。

【0057】

いくつかの実施形態では、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。いくつかの他の実施形態では、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が固形腫瘍の部位で本発明の1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。これらの実施形態の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は同一種のものである。これらの実施形態の別の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は異なる種（例えば、リステリア属とサルモネラ属）のものである。

【0058】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位に本発明の1つ以上の融合タンパク質および本発明の1つ以上のエフェクター分子を局所送達するための方法を提供する。好ましくは、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位で融合タンパク質とエフェクター分子の両方が発現されると、融合タンパク質のみまたはエフェクター分子のみが発現される場合に比べて、腫瘍または腫瘍細胞の増殖の阻害されるレベルが向上する。

【0059】

本発明はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱毒化腫瘍標的細菌における一次エフェクター分子および場合により二次エフェクター分子の発現を提供する。本発明の好ましい実施形態において、高められた放出は弱毒化腫瘍標的細菌による放出因子の発現と関係する。一つの実施形態では、かかる放出により細胞質または細胞周辺腔からのエフェクター分子の放出が増大する。放出因子は弱毒化腫瘍標的細菌に内因性のものであっても、外因性のものである（すなわち、弱毒化腫瘍標的細菌には本来存在しない核酸分子によりコードされるもの）であってもよい。放出因子はプラスミドからなる核酸によってコードされてもよいし、弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれる核酸によってコードされてもよい。放出因子は一次エフェクター分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じもの、または別個の核酸もしくはプラスミドでコードされ得る。放出因子は二次エフェクター分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じもの、または別個の核酸もしくはプラスミドでコードされ得る。好ましい実施形態において、放出因子はバクテリオシン放出タンパク質（BRP）である。特定の実施形態において、BRPはクロアシンDF13プラスミドのもの、コリンE1～E9プラスミドのもの、またはコリンA、NまたはDプラスミドのものである。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンDF13のもの（pC10DF13 BRP）である。本発明の別の実施形態では、高められた放出系はボー

(24)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

リントンパク質の過剰発現を含む。

【0060】

本発明はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱毒性腫瘍標的細菌における本発明の融合タンパク質の発現を提供する。特定の実施形態において、放出因子はOmp様タンパク質に融合された一次エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現する細胞において発現される。この実施形態では、放出因子の共発現が細胞周辺腔からの融合タンパク質の放出を高める。

【0061】

一つの実施形態において、本発明は、エフェクター分子または融合タンパク質を発現しながら腫瘍内に選択的に蓄積する、改変された弱毒性腫瘍標的細菌株を用いて、高レベルのエフェクター分子または融合タンパク質を送達するための方法を提供する。特定の構式において、改変された弱毒性腫瘍標的細菌株は腫瘍内でエフェクター分子を選択的に増幅する。以下の分節の教示内容は、単純化するために、特にサルモネラに関して述べるが、本発明の組成物および方法は、いかなる場合も、サルモネラに限定されるものではなく、その教示内容が当てはまる他のあらゆる細菌を包含するものである。特定的には、本発明は通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒性腫瘍標的細菌を提供する。弱毒性腫瘍標的細菌の例として、制限するものではないが、大腸菌（腸侵入性大腸菌を含む）、*Salmonella* spp.、*Shigella* spp.、*Yersinia enterocolitica*、*Listeria monocytogenes*、*Mycoplasma hominis*、および *Streptococcus* spp. が挙げられる。

【0062】

本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒性腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒性腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の本発明の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子（すなわち、一次および/または二次分子）をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒性腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。好ましい実施形態では、弱毒性腫瘍標的細菌がサルモネラである。

【0063】

本発明の医薬組成物は固形腫瘍の治療に有用である。固形腫瘍には、肉腫、癌腫、リンパ腫、その他の固形腫瘍（例えば、生殖細胞系の腫瘍、中枢神経系の腫瘍、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーム、脾臓癌、胃癌、肝癌、大腸癌、黑色素腫、腎臓癌、膀胱癌、中皮腫）が含まれるが、これらに限らない。

【0064】

本発明は、固形腫瘍の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒性腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、固形腫瘍の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒性腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、固形腫瘍の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは

(25)

JP 2004-300042 A 2004.1.8

哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。さらに、本発明は、固形腫瘍病の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療に必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本発明の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子（すなわち、一次および/または二次分子）をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラである。特定の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌が高められた放出系を含む。

【0065】

いくつかの実施形態においては、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、他の公知の治療法と共に使用することができる。例えば、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、化学療法剤と共に用いられる。化学療法剤の例として、制限するものではないが、シスプラチン、イホスファミド (ifosfamide)、バクリタキソール、タキサン類、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211）、ゲムシタビン (gemcitabine)、ビンORELBIN (vinorelbine)、オキサリプラチン (oxaliplatin)、5-フルオロウラシル (5-FU)、レウコボリン (leucovorin)、ビンORELBIN (vinorelbine)、テモダール (temodal)、タキソール、サイトカラシン (cytochalasin) E、グラシタジン D、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシジンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、メルファラン、グルココルチコイド類、プロカイ、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびビユーロマイシン同族体、ならびにサイトキシンが挙げられる。あるいはまた、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、放射線療法と共に用いられる。

【0066】

本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の連続的または並行投与を含む。本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の相加的または相乗的組合せを包含する。

【0067】

本発明はまた、作用部位がそれぞれ異なっている、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の組合せを包含する。そのような組合せは、その組合せが相加的であろうと相乗的であろうと、これらの治療薬の二重作用に基づく向上した治療を提供する。したがって、本発明の新規組合せ療法は、単一薬剤療法として用いられなければならない一方の薬剤と比べて、向上した効力をもたらす。

【0068】

3. 1. 定義と略語

本明細書で用いる用語「サルモネラ」とは、チフス菌、ブタコレラ菌、および腸炎菌等のすべてのサルモネラ種を包含する。また、例えば、腸炎菌の亜群であり、一般にネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) と呼ばれる、ネズミチフス菌等のサルモネラの血清型も含まれる。

【0069】

(26)

JP 2004-500642 A 2004.1.8

類似体： 本明細書で用いる用語「類似体」は、一次または二次エフェクター分子として類似または同一の機能を有するが、一次または二次エフェクター分子の類似または同一のアミノ酸配列を必ずしも含まない、あるいは、一次または二次エフェクター分子の類似または同一の構造を必ずしも有していないポリペプチドを意味する。類似アミノ酸配列を含むポリペプチドとは、下記事項の少なくとも1つを満たすポリペプチドを意味する：(a) 本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子のアミノ酸配列に対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド；(b) 少なくとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少なくとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、または少なくとも150個連続したアミノ酸残基の、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；(c) 本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド。本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した構造を有するポリペプチドとは、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した二次、三次または四次構造を有するポリペプチドを意味する。ポリペプチドの構造は、当業者には公知の方法により決定することができ、このような方法として、限定するものではないが、ペプチド配列決定、X線結晶検査、核磁気共鳴、円二色性、結晶電子顕微鏡検査法が挙げられる。

【0070】

抗血管新生因子： 抗血管新生因子は、抗血管新生活性を有するタンパク質性分子、あるいは、このようなタンパク質性分子をコードする核酸である。好ましい実施形態では、抗血管新生因子は、ペプチド断片、またはこれより大きいタンパク質の切断断片である。

【0071】

弱毒化： 弱毒化は、微生物またはバクテリアの病原性が弱まるような改変である。弱毒化が目的とする結果は、上記微生物またはバクテリアを患者に投与したとき、毒性や他の副作用等の危険性が低減することである。

【0072】

バクテリオシン： バクテリオシンは、細菌の宿主が毒素に対して免疫性であるという点で、選択的活性を有する細菌タンパク質性毒素である。バクテリオシンは、細菌の宿主ゲノムまたはプラスミドによりコードされ、広いもしくは狭い範囲の他の細菌に対して毒性であり、1つまたは2つのサブユニットからなる単純な構造であるか、あるいは、多サブユニット構造である。さらに、バクテリオシンを発現する宿主は、該バクテリオシンに対する免疫を有する。

【0073】

キレート剤感受性： キレート剤感受性は、細菌の増殖が影響を受ける有効濃度として定義されるか、または、回収可能なコロニー形成単位(c.f.u.)によって決定されるような、細菌の生存能力が低下する濃度として定義される。

【0074】

誘導体： 本明細書において、「ポリペプチドの誘導体」という表現で用いる用語「誘導体」とは、アミノ酸残基の置換、欠失もしくは付加の導入、またはあらゆるタイプの分子のポリペプチドへの共有結合により、改変された一次または二次エフェクター分子のようなポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。本明細書において、「一次または二次エフェクター分子の誘導体」という表現で用いられる用語「誘導体」は、例えば、あらゆるタイプの分子の上記一次または二次エフェクター分子への共有結合により、そのように修飾された一次または二次エフェクター分子を意味する。例えば、限定するものではないが、一次または二次エフェクター分子は、例えば、タンパク質分解断片、細胞リガンドもしくはその他のタンパク質との連結等により、修飾することができる。一次または二次エフェクター分子の誘導体は、当業者には公知の技法を用いた化学的修飾（例えば、アシル化、リン酸化、カルボキシル化、グルコシル化、セレン修飾および硫酸化）により修飾することができる。さらに、一次または二次エフェクター分子の誘導体は、1個以上の非古典的アミノ酸を含んでもよい。ポリペプチド誘導体は、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似または同一の機能を有する。本明細書において、「msbB⁻ 弱酸化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体」という表現で用いる用語「誘導体」は、国際公開番号WO 99/13053（本明細書に、参照により全文が組み込まれる）の第17頁に定義された修飾msbB⁻ ルモネラ突然変異体を意味する。

【0075】

断片： 本明細書で用いる用語「断片」とは、一次または二次エフェクター分子のアミノ酸配列の少なくとも2個連続したアミノ酸残基、少なくとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少なくとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、少なくとも150個連続したアミノ酸残基の、少なくとも175個連続したアミノ酸残基の、少なくとも200個連続したアミノ酸残基の、もしくは少なくとも250個連続したアミノ酸残基の、アミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを意味する。

【0076】

機能性断片： 本明細書で用いる用語「機能性断片」とは、上記一次または二次エフェクター分子の少なくとも1つの機能（例えば、エフェクター分子の酵素活性、抗血管新生活性、もしくは抗腫瘍活性等）を保持する一次または二次エフェクター分子の断片を意味する。

【0077】

融合タンパク質： 一次もしくは二次エフェクター分子のアミノ酸配列、またはその機能性断片もしくは誘導体と、異種ポリペプチド（例えば、非一次または非二次エフェクター分子）のアミノ酸配列と、を含むポリペプチドを意味する。

【0078】

Omp様タンパク質： 本明細書で用いる用語「Omp様タンパク質」とは、あらゆる細菌の外膜タンパク質またはその一部分（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、複数膜貫通ドメイン、またはこれらの組合せ）を意味する。具体的態様では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、IamB、 β -ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン結合リポタンパク質（PAL）、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、または主要な外膜リポタンパク質（例えばLLP）等の少なくとも一部分である。

【0079】

精製された： 本明細書で用いる「精製された」弱酸化腫瘍標的細菌株は、混入タンパク質またはアミノ酸（例えば、死滅した細菌からの残屑）または培地を実質的に含まない。

(28)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

混入タンパク質またはアミノ酸を實質的に含まない弱毒化腫瘍標的細菌株はまた、約30%、20%、10%、もしくは5%（乾燥重量基準）以下の混入タンパク質またはアミノ酸を含む弱毒化腫瘍標的細菌も意味する。

【0080】

放出因子： 本明細書で用いる放出因子は、細菌成分の放出を増強するあらゆるタンパク質またはその一部分を意味する。一実施形態では、放出因子は、バクテリオシン放出タンパク質である。放出因子としては、限定するものではないが、クロアシンD13プラスミドによってコードされるバクテリオシン放出タンパク質（BRP）、コリシンE1～E9プラスミドによりコードされるBRP、あるいは、コリシンA、NまたはDプラスミドによりコードされるBRPが挙げられる。

【0081】

敗血症性ショック： 敗血症性ショックは、TNF- α により開始される複合サイトカインカスケードによる内部臓器不全の状態である。微生物またはベクターがTNF- α を誘導する相対能力は、敗血症性ショックを誘導するその相対能力を示す1つの基準として用いられる。

【0082】

腫瘍標的（tumor-targeted）： 腫瘍標的とは、非癌性の対応細胞または組織に比べて、癌性の標的細胞または組織に優先的に局在化し、複製する能力として定義される。従って、サルモネラのような腫瘍標的細菌は、癌性の標的細胞または腫瘍環境に優先的に結合し、感染し、かつ／または依然として生存可能である。

【0083】

毒力： 毒力は、疾病を引き起こす一般的能力を表す相対語であり、正常細胞を死滅させる能力、または敗血症性ショック（以下の具体的定義を参照）を誘導する能力が含まれる。

【0084】

本明細書において、株の名称VNP20009（国際公開番号WO99/13053）、YS1646および41.2.9は、互換的に用いられ、それぞれ、American Type Culture Collectionに寄託され、受託番号202165が与えられた株を指す。株の名称YS1456および8.7は、互換的に用いられ、それぞれ、American Type Culture Collectionに寄託され、受託番号202164が与えられた株を指す。

【0085】

本発明は、以下に行く詳細な説明、具体的実施形態の例示、および添付の図面を参照することにより、さらによく理解されるであろう。

【0086】

4. 図面の簡単な説明

図面の簡単な説明については本明細書の最後を参照のこと。

【0087】

5. 本発明の詳細な説明

本発明は、弱毒化腫瘍標的細菌株を用いて、高レベルの治療用一次エフェクター分子を腫瘍に送達するものである。本発明は、所定の一次エフェクター分子の潜在的全身毒性（例えば、TNF- α によって起こる敗血症性ショック）を回避するという利点をもたらす。本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を固形腫瘍に送達する。さらに具体的には、本発明は、適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位への、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を送達するためのベクターとして、例えば、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌を調製および使用することを包含する。具体的には、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌であり、これらは、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードするように操作されている。

【0088】

ここに記載される弱毒化腫瘍標的細菌に基づく送達系は、固形腫瘍の部位への1つ以上のエフェクター分子の局所送達を提供する。本発明は、宿主に全身投与する場合には、毒性でありうる、または望ましくない副作用（例えば、望ましくない免疫作用）を誘発する恐れがある一次エフェクター分子を、宿主への毒性を低下させたサルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達することができる、安全かつ効果的な方法を提供する。本発明はまた、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌により送達される、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子の組合せ送達を提供する。さらに本発明は、1つ以上の異なる一次エフェクター分子、および場合に応じて、1つ以上の異なる二次エフェクター分子を保有する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組合せ送達を提供する。

【0089】

また、本発明は、固形腫瘍の部位で該融合タンパク質を発現させるように操作された弱毒化腫瘍標的細菌によって、エフェクター分子を含む1つ以上の融合タンパク質を局所送達する方法を提供する。一実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現するように操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、タンパク質分解切断部位と、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。さらに別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、タンパク質分解切断部位と、フェリペプチドと、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。弱毒化腫瘍標的細菌は、本発明の1つ以上の融合タンパク質と、本発明の1つ以上のエフェクター分子を発現させるように操作される。

【0090】

本発明はまた、製薬上許容される担体と、1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物も提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。

【0091】

本発明は、動物における固形腫瘍を治療する方法であって、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を、治療を要する動物に投与することを含んでなる方法を提供する。本発明はまた、動物における固形腫瘍を治療する方法であって、そのような治療が必要な動物に、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を投与することを含んでなる方法を提供する。さらに、本発明は、動物における固形腫瘍を治療する方法であって、そのような治療が必要な動物に、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を投与することを含んでなる方法を提供する。好ましくは、上記動物は、哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、サル、またはブタ）であり、さらに好ましくは、動物はヒトである。固形腫瘍の例として、限定するものではないが、肉腫、癌腫、リンパ腫が挙げられ、その他の固形腫瘍として、限定するものではないが、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーマ、脾臓癌、胃癌、肝臓癌

(30)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

、大腸癌、中枢神経系の癌、生殖細胞系の癌、腎臓癌、膀胱癌、および中皮種が挙げられる。

【0092】

特定の作用機構に制限する意図はないが、本発明者らは、本発明に従い、エフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌バクテリアの送達によって、腫瘍の部位にエフェクター分子の標的発現が達成されると考える。

【0093】

明瞭にするため、詳細な説明を次の小節に分けるものとする：細菌バクテリア；腫瘍治療のための一次エフェクター分子；一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクター分子；誘導体と類似体；融合タンパク質；発現バクテリア；ならびに、送達のための方法および組成物。

【0094】

5. 1. 細菌バクテリア

本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いることができる。さらに具体的に、本発明の方法で用いられる弱毒化腫瘍標的細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌である。本発明の方法で用いられる、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌の例としては、限定するものではないが、腸管組織侵入性大腸菌等の大腸菌、サルモネラ種 (*Salmonella* spp.)、赤痢菌種 (*Shigella* spp.)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、単球症リステリア (*Listeria monocytogenes*)、ヒトマイコプラズマ (*Mycoplasma hominis*)、およびレンサ球菌種 (*Streptococcus* spp.) が挙げられる。

【0095】

弱毒化および腫瘍ターゲット팅に寄与する因子を本明細書に記載するが、これらを用いて、本発明の方法で使用する好適な細菌株を構築または選択することができる。例えば、腫瘍標的細菌を選択および単離する方法については、国際公開番号WO96/40238の第6、1節に記載され、また、細菌を弱毒化する方法については、同第6、2節に記載されている。尚、この文献は、参照により本明細書に全文を組み込むものとする。弱毒化腫瘍標的細菌の例は、国際出願WO99/13053（参照により本明細書に全文を組み込む）にも記載されている。本発明の特定の実施形態では、当業者には公知の方法で細菌を修飾することにより、弱毒化または高度に弱毒化することができる。

【0096】

本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子（例えば、TNFファミリーメンバー、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチド、腫瘍阻害酵素、もしくは抗血管新生因子）を単独で、または1つ以上の二次エフェクター分子と組み合わせて送達するバクテリアとして、弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明はまた、1つ以上の本発明の融合タンパク質を単独で、または1つ以上のエフェクター分子と組み合わせて送達するバクテリアとして、弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態では、エフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、サルモネラである。

【0097】

以下の節では、特にサルモネラに関して教示するが、本発明の組成物および方法は、何らサルモネラに限定されるわけではなく、教示が適用するあらゆる他の細菌を包含する。適した細菌種として、限定するものではないが、腸管組織侵入性大腸菌等の大腸菌、サルモネラ種、赤痢菌種、エルシニア・エンテロコリチカ、単球症リステリア、ヒトマイコプラズマ、およびレンサ球菌種が挙げられ、ここで、該細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌である。

【0098】

5. 1. 1 サルモネラバクテリア

本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を修飾して、1つ以上の一次エフェク

ター分子および場合に依じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードすることにより、本発明の1つ以上のエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫瘍標的細菌を作製することができる。さらに、本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を修飾して、本発明1つ以上の融合タンパク質および場合に依じて、本発明の1つ以上のエフェクター分子をコードすることにより、本発明の融合タンパク質およびエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫瘍標的細菌を作製することができる。

[0099]

サルモネラ等の細菌は、ヒトおよび動物の疾病を引き起こす病原体である。サルモネラによって発生し得る疾病の1つは、敗血症であり、これは、敗血症性ショックの発作に関連する高い死亡率 (Bone, 1993, *Clinical Microbiol. Revs.*, 6:57-68) のために、深刻な問題である。従って、本発明で、サルモネラバクターを安全に使用できるようにするためには、サルモネラ等の細菌バクターの病原性を低減 (弱毒化) する。本発明では、弱毒化は、微生物バクターを修飾することにより、該微生物バクターの病原性を低減するという従来の定義に加えて、微生物バクターを修飾することにより、低力価の該誘導微生物バクターを患者に投与し、それでも尚、高力価の親微生物バクターを投与したのと同等の結果を達成できるようにすることも含む。その結果、バクターを患者に投与したことによる毒性ショックまたはその他の副作用の危険性を低下させることができる。このように弱毒化された細菌は、多数の技法により単離される。例えば、宿主細胞、特にマクロファージおよび好中球内の細菌の生存を確実にし、弱毒化 (virulence) 因子をコードするDNA配列の欠失または破壊により、弱毒化を達成することができる。このような欠失または破壊技法は、当業者には公知であり、例えば、相同的組換え、化学的突然変異誘発、放射線突然変異誘発、もしくはトランスポゾン突然変異誘発が挙げられる。マクロファージ内での生存に関連するビルレンス因子は、例えば、酸化のようなストレスシグナルに反応して、またはマクロフィノサイトシス等の宿主細胞防御機構に反応して、通常、マクロファージ内で特異的に発現される (Fields et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5189-5193)。国際公開番号WO96/40238の表4には、欠失によって弱毒化が起こるサルモネラ・ビルレンス因子が例示的に列挙されている。

[0100]

サルモネラのような細菌バクターの弱毒化の別の方法は、細菌の毒性の原因となる細菌の置換基を修飾するものである。例えば、リポ多糖 (LPS) または内毒素は、細菌性敗血症の病理作用の主な原因である。この応答を起こすLPSの成分は、リビドA (「LA」) である。LAの毒性作用の排除または軽減により、1) 患者における敗血症性ショックの危険性が低下すると共に、2) さらに高レベルの細菌バクターを許容できることから、弱毒化細菌が得られる。

[0101]

サルモネラのような細菌のLA含有率の改変は、LPS生合成経路に突然変異を導入することにより達成することができる。LPS生合成におけるいくつかの酵素段階、およびサルモネラ内でそれらを制御する遺伝子座、ならびに対応する突然変異体が確認されている (Raetz, 1993, *J. Bacteriol.*, 175:5745-5753) およびその中の参考文献)。このような突然変異体の一例として、*firA*があるが、これは、酵素UDP-3-O (R-30ヒドロキシミristol) グリコシアミンN-アシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子内の突然変異であり、該酵素は、内毒素生合成における第3段階を調節する (Kelley et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268:19866-19874)。このタイプの突然変異を担持する細菌株はリビドAを生産するが、これは第7脂肪酸、すなわちヘキサデカン酸、を含むという点で野生型リビドAとは異なる (RoyおよびColeman, 1994, *J. Bacteriol.*, 176:1639-1646)。RoyおよびColemanは、内毒素生合成における第3段階の遮断のほかに、*firA* 突然変異は、リビドA生合成の第6段階を

調節するリビドA 4' キナーゼの酵素活性を低下させることも明らかにした。

[0102]

弱毒化に加えて、本発明の細菌ベクターは腫瘍ターゲティングされる。すなわち、細菌は、正常組織、非腫瘍または非腫瘍細胞に対して、腫瘍または腫瘍細胞に優先的に結合し、感染し、かつ/またはは依然として生存可能である。弱毒化腫瘍標的細菌を取得するのに適した方法は、国際公開WO96/40238の第6、1節(第25~32頁;腫瘍ターゲティング)および第6、2、2節(第43~51頁;弱毒化)に記載されており、該文献は、参照により本発明に組み込まれるものとする。こうして得られるベクターは高度に特異的で、かつ高感染性であることから、標的腫瘍または腫瘍細胞に存在する感染細菌の数と、非毒性対応部でのそれとの差は、微生物培養物の希釈度が増加するほど大きくなるため、これまでより低力価の微生物ベクターを用いて、正の結果を得ることができる。また、国際公開WO96/40238に記載される技法を用いて、弱毒化腫瘍標的サルモネラまたは非サルモネラ細菌ベクターを作製することも可能である。

[0103]

LSP経路突然変異を有する弱毒化腫瘍標的細菌の一例が、国際公開WO99/13053に記載されたmsbB⁻サルモネラ突然変異体である。尚、該文献は、参照により本明細書に組み込むものとする。特に、msbB⁻サルモネラ突然変異体の特徴について説明する第6、1、2節を参照されたい。msbB⁻サルモネラの1つの特徴は、野生型細菌ベクターと比較して、TNF- α 応答を誘導する能力が低下していることである。msbB⁻サルモネラは、野生型細菌ベクターの誘導レベルと比較して、約5%から約40%のレベルでTNF- α 発現を誘導する。

[0104]

全細菌または単離もしくは精製されたLPSにより誘導されるTNF- α 応答は、固相酵素免疫検定法(BLISA)等、市販のアッセイ装置を用いて、*in vitro*または*in vivo*で評価することができる。コロニー形成単位(c.f.u.)当たりの、または $\mu\text{g}/\text{kg}$ に基づくTNF- α 生産の比較を用いて、相対活性を決定する。単位当たりのTNF- α レベルが低いほど、TNF- α 生産の誘導が減少していることを示す。好ましい実施形態では、msbB⁻サルモネラベクターを修飾して、本発明の1つ以上の一次エフェクター分子および場合に依りて、1つ以上の二次エフェクター分子を含むようにする。

[0105]

本発明はまた、msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体の使用も包含する。本発明の教示に従い、msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体を修飾し、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に依りて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードすることにより、本発明の1つ以上のエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の腫瘍標的細菌を作製することができる。

[0106]

患者への治療の過程で、さらに毒性の高い表現型に復帰しないような、弱毒化表現型の安定性は重要である。このような安定性は、例えば、ビルレンス遺伝子が、エピスタシス(epistatically)ではなく、欠失または染色体レベルでのその他の非復帰突然変異によって破壊されるように備えることにより、獲得することができる。

[0107]

弱毒化表現型を安全にする別の方法は、例えば、msbB⁻突然変異(国際公開WO99/13053)のように、リビドA生産用の経路における突然変異や、Bochner, 1980, J. Bacteriol., 143:926-933により記載されたウラシル合成、プリン合成、およびアルギニン合成のように、1以上の栄養素または代謝物の栄養要求性突然変異体への1以上の突然変異等、1以上の方法で弱毒化されるように、細菌を操作することである。好ましい実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコードまたは発現する腫瘍標的msbB⁻サルモネラもまた、プリンに対して栄養要求性である。特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコー

ドまたは発現する弱毒化腫瘍標的細菌は、AroA、msbB、PurIまたはSerCにおける突然変異の存在によって、弱毒化される。他の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコードする弱毒化腫瘍標的細菌は、AroA、msbB、PurIまたはSerCにおける欠失の存在によって、弱毒化される。

[0108]

従って、本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いて、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に依りて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現し、固形腫瘍に送達することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に依りて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現するように構築する。さらに、本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いて、1つ以上の融合タンパク質および場合に依りて、1つ以上のエフェクター分子を発現し、固形腫瘍に送達することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の融合タンパク質および場合に依りて、1つ以上のエフェクター分子を発現するように構築する。

[0109]

5. 2. 腫瘍治療のための一次エフェクター分子

本発明は、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌による、一次（および場合に依りて、二次）エフェクター分子の送達を達成する。本発明のエフェクター分子は、タンパク質性分子（例えば、タンパク質（限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、翻訳後修飾タンパク質等を含む））である。本発明はさらに、本発明の一次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。

[0110]

一次エフェクター分子は、あらゆる公知の生物、例えば、限定するものではないが、動物、植物、細菌、真菌、および原生生物、またはウイルス等によ来するものでよい。本発明の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、哺乳動物によ来する。さらに好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、ヒトによ来する。本発明の一次エフェクター分子は、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチド、腫瘍阻害酵素、ならびに、これらの機能性断片を含む。

[0111]

具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、TNFファミリーのメンバーまたはその機能性断片である。TNFファミリーのメンバーの例としては、限定するものではないが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIG HT、TL1、TNFSF16、TNFSF16、TNFSF17およびAITR-Lが挙げられる。好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、もしくはこれらの機能性断片である。これらについて詳しくは、例えば、TNFファミリーのメンバーを記載したKwon, B.ら、1999, Curr. Opin. Immunol. 11:340-345を参照されたい。また、以下の表1は、TNFファミリーのメンバー例の古典的名称および標準化された名称の一覧を示す。本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、もしくはCD40リガンド (CD40L) である。

(34)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0112】

【表1】

TNF ファミリーのメンバー	
古典的名称	標準化された名称
LT- α	TNFSF1
TNF- α	TNFSF2
LT- β	TNFSF3
OX40L	TNFSF4
CD40L	TNFSF5
F ₂ L	TNFSF6
CD27L	TNFSF7
CD30L	TNFSF8
4-1BBL	TNFSF9
TRAIL	TNFSF10
TRANCE	TNFSF11
TWEAK	TNFSF12
APRIL	TNFSF13
LIGHT	TNFSF14
TL1	TNFSF15
---	TNFSF16
---	TNFSF17
ATIR-L	TNFSF18

【0113】

別の具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、抗血管新生因子もしくはその機能性断片である。抗血管新生因子の例として、限定するものではないが、エンドスタチン、アンギオスタチン、アボミグレン、抗血管新生抗トロンビンIII、フィブロネクチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7、8 kDaタンパク質分解断片、13、40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGR含有ペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンおよびEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならびに、インテグリン α 、 β 、およびVEGF受容体のペプチドアンタゴニストが挙げられる。

【0114】

本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチンである。天然のエンドスタチンは、コラーゲンXVIIのC末端の約180アミノ酸からなる（コラーゲンXVIIの2つのスプライス形態をコードするcDNAは、Genbank登録番号AF1801およびAF18082を有する）。

【0115】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、プラスミノゲン断片である（プラスミノゲンのコード配列は、Genbank登録番号NM-000301およびA33096）にみいだすことができる）。アンギオスタチンペプチドは、言うまでもなく、プラスミノゲンの4つのクリングルドメイン、すなわち、クリングル1〜クリングル4を含む。組換えクリングル1、2および3は、天然ペプチドの抗血管新生特性を有するのに対し、クリングル4にはそのような活性がない（Caoら、1996、J. Biol. Chem. 271:29461-29567）。従って、本発明のアンギオスタチンエフェクター分子は、クリングル1、クリングル2およびクリングル3からなる群より選択される少なくとも1つの、好ましくは、1つ以上のクリングルドメインを含む。具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、40 kDa型、42 kDa型、45 kDa型、またはこれらの組合せからなる群より選択されるヒトアンギオスタチン分子である。別の実施形態では、該一次エフェクター分子は、プラスミノゲンのクリングル5ドメインであり、これは、アンギオスタチン（アンギオスタチンはクリングルドメイン1〜4からなる）より強力な血管新生阻害物質である。

【0116】
別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、アンチトロンビンIIIである。アンチトロンビンIIIは、以後アンチトロンビンと呼び、これは、タンパク質を血管壁に連結するヘパリン結合ドメインと、トロンビンと相互作用する活性部位ループとを含む。アンチトロンビンをヘパリンと結合させると、タンパク質はコンホメーション変化を引き起こし、これによって、活性ループがトロンビンと相互作用し、その結果、トロンビンによる該ループのタンパク質分解切断が起こる。タンパク質分解切断事象により、アンチトロンビンのコンホメーションにさらに別の変化が起こり、これによって（i）トロンビンとアンチトロンビンとの間の相互作用界面が改変され、（ii）ヘパリンから複合体が放出される（Carrell, 1999, Science 285:1861-1862、およびその中の参考文献）。O'Reillyら（1999, Science 285:1926-1928）は、切断されたアンチトロンビンが、強力な抗血管新生活性を有することをみいだした。従って、一実施形態では、本発明の抗血管新生因子は、抗血管新生形態のアンチトロンビンである。本発明の方法に従う固形腫瘍への上記タンパク質の送達のために、細菌ベクターを修飾し、全長アンチトロンビンGenbank登録番号NM-000488およびアンチトロンビンの切断を触媒するタンパク質分解酵素を発現させることにより、抗血管新生形態のタンパク質を生成する。タンパク質分解酵素は、トロンビン、キモトリプシン、およびヒト好中球エラスターゼである。機能的キモトリプシン/エラスターゼの組換え発現の方法は、Shirasuにより教示されている（Shirasuら、1987, J. Biochem. 102:1555-1563）。

【0117】
本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、フィブロネクチンの40 kDaおよび/または29 kDaタンパク質分解断片である。これら断片の発現ベクターは、フィブロネクチン前駆体タンパク質をコードする全長核酸配列（Genbank登録番号X02761）、およびコードされたタンパク質の成熟化についての記載事項（description）を用いた標準的方法により生成することができる。好ましい実施形態では、フィブロネクチンの40 kDaおよび/または29 kDa断片は、例えば、pTrec9Aプラスミドへの挿入により、trecプロモーターの制御下で細胞質タンパク質として発現させる。

【0118】
本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子（uPA）受容体のアンタゴニストである。実施形態の一例では、該アンタゴニストは、uPAのドミナントネガティブ突然変異体である（例えば、Crowleyら、1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5021-5025）。実施形態の別の態様では、アンタゴニストは、ペプチドアンタゴニス

(36)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

トまたはその融合タンパク質である (Goodsonら、1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7129-7133)。実施形態のさらに別の態様では、アンタゴニストは、ドミナントネガティブ可溶性uPA受容体である (Minら、1996, *Cancer Res.* 56:2428-2433)。

[0119]

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、約120のアミノ酸からなる、プロラクチンの16 kDa N末端断片、またはその生物学的に活性な断片である (プロラクチンのコード配列は、Genbank登録番号NM_000948にみいだすことができる)。具体的実施形態では、上記プロラクチン断片は、ジスルフィド結合によるタンパク質の不要な架橋を回避するため、Cys58-Ser58突然変異を有する。 10

[0120]

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、7.8 kDa、血小板第4因子断片である。具体的実施形態では、7.8 kDa 血小板第4因子断片は、融合タンパク質として発現され、該融合タンパク質において、アミノ末端は、大腸菌βグルコニダーゼの最初の35アミノ酸からなる。別の実施形態では、血小板第4因子のヘパリン結合性リシンをグルタミン酸残基に突然変異させることにより、強力な抗血管新生活性を有する変異型タンパク質が得られる (Maioneら、1991, *Cancer Res.* 51:2077-2083)。血小板第4因子のコード配列は、Genbank登録番号NM-002619である。

[0121]

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、血小板第4因子の抗血管新生13アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロポスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリンα、β、もしくはVEGF受容体の小さいペプチドアンタゴニストに相当する小さなペプチドである。具体的実施形態では、小さいペプチドをタンデムに発現させることにより、タンパク質安定性が高まる。小さいペプチドの配列は、VEGF受容体アンタゴニスト (Sokerら、1993, *J. Biol. Chem.* 272:31582-31588)を除いて、Cao (1998, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20:161-176)により提供されている。極めて好ましい実施形態では、小さいペプチドは、RGDまたはNGRモチーフを含む。この実施形態の特定の様式では、RGDまたはNGRモチーフを含むペプチドは、例えば、OmpAの1つ以上の細胞外ループをコードする核酸と、読み枠を合わせると該ペプチドをコードする核酸を融合することにより、宿主細胞の細胞表面上に提示される。 30

[0122]

別の具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチド、もしくはそれらの機能性断片である。細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチドは、例えば、タンパク質合成の干渉または細胞周期の破壊を介して、細胞増殖を阻害することにより、細胞に対して毒性を有するか、または細胞分裂を抑制する。このような物質は、rRNAまたはリボタンパク質を切断するか、伸長因子を阻害するか、mRNAを切断することにより、あるいは、タンパク質合成を、細胞が生産できないようなレベルにまで低下させるその他の機構によって、作用すると考えられる。 40

[0123]

細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチドの例として、限定するものではないが、下記のもの挙げられる：バクテリオシンファミリーのメンバー、ペロ毒素、細胞傷害性壊死因子1 (CNF1; 例えば、大腸菌CNF1および*Vibrio fischeri* CNF1)、細胞傷害性壊死因子2 (CNF2)、*Pasteurella multocida* 毒素 (PMT)、溶血素、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害物質であるCAAXテトラペプチド、サボリン、リシン、アブリン、その他のリボソーム不活性化タンパク質 (RIP)、シュードモナス外毒素、DNA、RNAまたはタンパク質合成の 50

阻害剤、アンチセンス核酸、その他の代謝阻害物質（例えば、DNAアーゼおよびリボヌクレアーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ホスホリラーゼ等のDNAまたはRNA切断分子）、プロドラッグ変換酵素（例えば、HSV由来のチミジンキナーゼおよび細菌シトシンデアミナーゼ）、光活性化ポルフィリン、リシン、リシンA鎖、トウモロコシRIP、ゲロニン、細胞致死性大（cytotoxicity inducing）毒素、ジフテリア毒素、ジフテリア毒素A鎖、トリコサンチン、トリチン、アメリカマダボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）、ミラビリシ（mirabilis）抗ウイルスタンパク質（MAP）、ジアンチン32および30、アプリン、モノドリ、ブリオジン、志賀毒素（shiga）、キュウリの種子からのタンパク質合成の触媒阻害物質（例えば、国際公開W/O93/24620を参照）、シュートモナス外毒素、大腸菌熱不安定性毒素、大腸菌熱安定性毒素、BaggEC安定性毒素-1（EAST）、細胞毒素の生物学的に活性の断片、ならびに、当業者には公知のその他の物質。大腸菌およびサルモネラの毒素については、例えば、Escherichia and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt (編) におけるO' BrianおよびHolmesによるProtein Toxins of Escherichia coli and Salmonella, pp. 2788-2802, ASM Press, ワシントンD. C. を参照されたい。

[0124]

好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、バクテリオシンファミリーのメンバー（例えば、Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144参照）であるが、ただし、該バクテリオシンファミリーのメンバーは、バクテリオシン放出タンパク質（BRP）ではない。バクテリオシンファミリーのメンバーの例として、限定するものではないが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、バスチンA1122、スタフィロコクシン1580、プテリシン7423、ピオシンR1またはAP41、メガシンA-216、ミクロシンM15、およびピリオシン（JayawardeneおよびFarkas-Himsley, 1970, J. Bacteriology vol. 102 pp 382-388）が挙げられる。最も好ましくは、一次エフェクター分子は、コリシンE3またはVであるが、コリシンA、E1、E2、1a、1b、K、L、およびM（Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144参照）も、一次エフェクター分子として適している。この実施形態の別の好ましい態様では、バクテリオシンは、クロアシンであり、最も好ましくは、クロアシンDF13である。

[0125]

好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、ColE1、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、またはColE9である。コリシンE3（ColE3）は、白血病細胞モデル系（Fiskaら, 1978, Experientia 35:406-40）等の哺乳動物細胞（Smardaら, 1978, Folia Microbiol. 23:272-277）に深く細胞傷害性作用を及ぼすことがわかっている。ColE3の細胞毒性は、タンパク質合成を停止する機能であり、これは、80Sリボソームの阻害により媒介される（Turnowskyら, 1973, Biochem. Biophys. Res. Comm. 52:327-334）。さらに具体的には、ColE3は、リボヌクレアーゼ活性（Saunders, 1978, Nature 274:113-114）を有する。その天然形態では、ColE3は、1:1の比で50kDaおよび10kDaタンパク質からなる60kDaタンパク質複合体であり、大きい方のサブユニットはスクレアーゼ活性を有し、また、小さい方のサブユニットは50kDaサブユニットの阻害機能を有する。このように、50kDaタンパク質は、細胞傷害性タンパク質（または毒素）として作用し、10kDaタンパク質は、抗毒素として作用する。従って、一実施形態では、ColE3を二次エフ

(38)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

エフェクター分子として用いる場合には、大きい方のColE3サブユニットもしくはその活性断片を単独で、または小さい方のサブユニットより高いレベルで発現させる。本発明の別の実施形態では、ColE3 50 kDa毒素および10 kDa抗毒素を、サルモネラ等の弱毒性腸菌標的細菌内の単一プラスミドにコードさせる。この実施形態では、毒素/抗毒素は、プラスミドを保有するサルモネラの選択系として作用することができ、これにより、該プラスミドを欠失したサルモネラは上記毒素により死滅する。別の実施形態では、10 kDa抗毒素は、プラスミド上のcolE3毒素から離れて染色体上にあり、他の細菌に対する透過障壁を形成している（以下の第5、6節を参照）。

【0126】

本発明の別の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、クロアシンDF13である¹⁹。クロアシンDF13は、ColE3と同様に機能する。タンパク質複合体は、67 kDa分子量である。個々の成分のサイズは、57 kDaおよび9 kDaである。リボスクレアゼ活性以外に、DF13は、細胞カリウムの漏出を引き起こすことができる。

【0127】

別の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、コリシンVである（Plasmids, A Practical Approach 1987, K. G. Hardy編におけるPugsley, A. P. およびOudega, B. による"Methods for Studying Colicins and Their Plasmids"; Gilson, L. ら、EMBO J. 9:3875-3884）。

【0128】

別の実施形態では、一次エフェクター分子は、下記のものである：コリシンE2（構造は、ColE3に類似した二重サブユニットであるが、リボスクレアゼ活性ではなく、エンドヌクレアーゼ活性を有する）；イオン透過性チャンネルを形成し、細胞のプロトン駆動力を崩壊させ、細胞死に至らしめるコリシンA、E1、Ia、IbまたはK；タンパク質、DNAおよびRNA合成を阻害するコリシンL；細胞の浸透圧環境を改変することにより、細胞敗血症を引き起こすコリシンM；コリシンBと同様に機能するベスチシンA1122；細胞形成バクテリオシンであるスタフィコシン1580；未知の標的を介して、RNA、DNAおよびタンパク質合成を間接的に阻害するブナリシン7423；ピオシンP1、すなわち、溶質輸送からの呼吸を脱共役することにより、細胞を死滅させるバクテリオファージテールタンパク質に似たタンパク質；コリシンE2様の作用を有するピオシンAP41；または細胞内物質の漏出を引き起こすホスホリパーゼであるメガシンA-216（バクテリオシンの概要については、Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144を参照）；コリシンA（Plasmids, A Practical Approach 1987, K. G. Hardy編におけるPugsley, A. P. およびOudega, B. による"Methods for Studying Colicins and Their Plasmids"）。

【0129】

従って、一次エフェクター分子は、本明細書に記載した、または当業者には公知のあらゆるバクテリオシンを含んでよいが、ただし、該バクテリオシンは、バクテリオシン放出タンパク質ではない。

【0130】

別の具体的な実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍阻害酵素またはその機能断片である。腫瘍阻害酵素の例として、限定するものではないが、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、リボスクレアゼ、DNAアーゼ、およびグリコシダーゼが挙げられる。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、メチオナーゼである。

【0131】

本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫等の固形腫瘍癌を治療または予防する上で有用である。

50

【0132】

本発明は、一次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。本発明は、適したプロモーターに機能的に連結された本発明のエフェクター分子をコードする核酸を提供する。場合に応じて、エフェクター分子をコードする核酸は、転写、翻訳、局在化、安定性等に関与するその他のエレメントに機能的に連結することもある。

【0133】

一次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6～約100,000塩基対である。好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約50,000塩基対である。さらに好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約10,000塩基対である。さらにまた好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約4,000塩基対である。

【0134】

5. 3. 一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクター分子
本発明の特定の実施形態では、一次エフェクター分子（例えば、TNFファミリーのメンバー、細胞傷害性ペプチドもしくはポリペプチド、抗血管新生因子、または腫瘍抑制酵素）は、場合に応じて、別の分子、すなわち、二次エフェクター分子と一端に、細菌ベクター内で共発現させる。二次エフェクター分子は、付加的治療価値を提供し、かつ/または、周囲の環境へ（少なくとも1種の一次エフェクター分子、および、場合に応じて、1以上の二次エフェクター分子を発現させる）修飾細菌ベクターの内容物の放出を促進する。本明細書で用いる用語「付加的治療価値」とは、一次エフェクター分子が提供するもの以外に、二次エフェクター分子が、腫瘍に対し、付加的もしくは相乗的、細胞分裂抑制性、または細胞傷害性作用をもたらすことを指す。従って、二次エフェクター分子は、付加的治療因子および/または放出因子として機能する。好ましくは、二次エフェクター分子は、付加的治療因子もしくは放出因子（または両方）のいずれであっても、所望の部位、すなわち、腫瘍の部位で、優先的または特異的に活性化もしくは発現させる。特定の形態では、二次エフェクター分子は、2つの機能を果たす、すなわち、細菌細胞内容物の放出を促進する（例えば、細菌細胞溶解または単溶解を促進することにより）と同時に、治療価値を提供する（例えば、腫瘍細胞に対する細胞毒性により）ことができる。特定の非制限の実施形態では、二次エフェクター分子の細胞毒性は、患者の免疫系が介在する；従って、このような二次エフェクター分子は、免疫調節剤として機能することができる。

【0135】

本明細書の特定の形態では、本発明の弱毒性腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活性を有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現させるように操作する。すなわち、二次エフェクター分子の発現により、腫瘍または腫瘍細胞の死滅または成長の阻害が起こる。

【0136】

二次エフェクター分子は、タンパク質または核酸分子である。核酸分子は、二本鎖もしくは一本鎖DNAまたは二本鎖もしくは一本鎖RNA、ならびに、三重らせん核酸分子のいずれでもよい。核酸分子は、リボザイム、またはアンチセンス核酸等として機能することができる。

【0137】

アンチセンスヌクレオチドは、mRNAまたはDNA等の核酸に、配列特異的に結合するオリゴヌクレオチドである。相補的配列を有するmRNAに結合すると、アンチセンスは、mRNAの翻訳を阻止する（例えば、米国特許第5,168,053；5,190,931；5,135,917；および5,087,617号参照）。三重らせん分子とは、二重らせんDNAと結合して、共直線性三重らせん分子を形成し、これにより、転写を阻止する一本鎖DNAを意味する（例えば、米国特許第5,176,996号を参照）。

【0138】

(40)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

リボザイムは、mRNA等のRNA基質を特異的に切断することにより、細胞成長もしくは発現を阻害または干渉するRNA分子である。RNA鎖の切断および/または連結に関与するリボザイムとして、少なくとも5クラスのリボザイムが知られている。リボザイムは、任意のRNA転写産物を標的とすることができ、その転写産物を触媒的に切断することができる（例えば、米国特許第5,272,262号；米国特許第5,144,019号；および米国特許第5,168,053、5,180,818、5,116,742および5,093,246号を参照）。

[0139]

一次エフェクター分子についてすでに記載したように、二次エフェクター分子をコードまたは含有する核酸には、機能的連結で、選択したプロモーターを付与する、また、場合に応じて、機能的連結で、転写、翻訳、局在化、安定性および/またはその他に参加する他のエレメントを付与する。さらに、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子および内部リボソーム結合部位と同じプロモーターを用いて、または、一次エフェクター分子とは異なるプロモーターを用いて、発現させることができる。

[0140]

二次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6塩基対から約100,000塩基対である。好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約50,000塩基対である。より好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約10,000塩基対である。さらに好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約4,000塩基対である。

[0141]

下記の二次エフェクター分子をコードするエフェクター分子のヌクレオチド配列は、よく知られている（GenBank参照）。二次エフェクター分子（この二次エフェクター分子は、細胞傷害性もしくは細胞分裂抑制因子、またはその生物学的に活性の断片、変異体もしくは誘導体である）をコードする核酸分子は、増幅（例えば、PCR）、ゲノムまたはcDNAライブラリーのプローブハイブリダイゼーション、発現ライブラリーの抗体スクリーニング等の標準的方法により単離してもよいし、化学的に合成しても、または市販のもの、もしくは他の供給源から得られたものでもよい。

[0142]

本明細書に記載した用途で使用する核酸分子およびオリゴヌクレオチドは、当業者には公知である任意の方法により合成することができる（例えば、国際公開WO93/01286、米国特許第5,218,088；5,175,269；および5,109,124号参照）。アンチセンス試薬として使用するオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの同定は、当業者には公知の方法を含む。

[0143]

5.3.1. 付加的治療価値をもたらす因子

本発明の特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好ましくは、サロネラバクターである本発明の弱毒性腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活性を有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現する。すなわち、該二次エフェクター分子の発現により、腫瘍もしくは腫瘍細胞の死滅、またはそれらの成長の阻害、あるいは、腫瘍細胞の転移の阻害が起こり、これによって、一次エフェクター分子の細胞傷害性または細胞分裂抑制作用を増強する。一実施形態では、二次エフェクター分子の腫瘍への作用は、一次エフェクター分子の作用に付加的なものである。好ましい実施形態では、この作用は、相付加的または相乗的である、すなわち、一次および二次エフェクター分子を個別に投与した場合の作用を合わせたものより大きい。

[0144]

特定の実施形態では、二次エフェクター分子は、タンパク質合成との干渉、または細胞周期の破壊により細胞成長を阻害することによって、細胞に対し、細胞傷害性または細胞分裂抑制性である。このような物質は、例えば、rRNAもしくはリボ核タンパク質を切断する、伸張因子を阻害する、mRNAを切断する、または、タンパク質合成を細胞が生存

(41)

JP 2004-500642 A 2004.1.8

できないレベルまで低下させるその他の機構により、作用すると考えられる。このような二次エフェクター分子の例として、限定するものではないが、サボリン、リシン、アブリン、およびその他のタンパク質不活性化リポソーム (RIP) が挙げられる。

[0145]

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、プロドラッグ変換酵素またはこれをコードする核酸、すなわち、薬物の化学的性質を調節して、細胞傷害性薬剤を生成する酵素である。プロドラッグ変換酵素の例は、Pawelekらにより国際公開WO 96/40238の第33頁の表2に一覧が記載されている。尚、この文献は、参照により本明細書に組み入れる。国際公開WO 96/40238はまた、このようなプロドラッグ変換酵素を含む分泌融合タンパク質の生成方法も教示している。本発明によれば、プロドラッグ変換酵素は、BRPのような放出因子と共発現させた場合、分泌タンパク質である必要はない（以下の第5.3.2節を参照）。具体的実施形態では、プロドラッグ変換酵素は、マイトマイシンCおよびボルフィロマイシン (Murrayら, 1994, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 270:645-649) に作用するシトクロム p450 NADPHオキシドレダクターゼである。別の実施形態では、二次エフェクター分子を、BRPのような放出因子と共発現させて、補因子 (例えば、NADH、NADPH、ATP等) の放出を起こすことにより、プロドラッグ変換酵素の活性を増強する。この実施形態の別の態様では、二次エフェクター分子を、BRPのような放出因子と共発現させて、活性化薬物 (例えば、細菌細胞質または周辺細胞質内で活性化され、細菌ペクターから放出された薬物) を放出させる。

[0146]

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、誘導性酸化窒素シンターゼ (NOS) または内皮性酸化窒素シンターゼの阻害剤である。酸化窒素 (NO) は、血管成長の調節および動脈硬化に関与すると考えられている。NOは、酸化窒素シンターゼ (NOS) によりL-アルギニンから形成され、免疫、炎症および心臓血管応答を調節する。

[0147]

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、癌遺伝子もしくは増殖因子 (例えば、bFGF、int-2、hst-1/K-FGF、FGF-5、hst-2/FGF-6、FGF-8) または細胞受容体もしくはリガンド等の細胞増殖に関与するタンパク質の生成または活性を阻害することによって、細胞に対し、毒性を有する、または細胞分裂を抑制する。阻害は、転写または翻訳 (リボザイムまたは三重らせんDNAである二次エフェクター分子により媒介される) のレベルで、あるいは、タンパク質活性 (ドミナントネガティブ突然変異体等の増殖因子経路の阻害剤である二次エフェクター分子により媒介される) のレベルで、行うことができる。

[0148]

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、サイトカイン、ケモカイン、または免疫調節タンパク質もしくはこれをコードする核酸、例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18)；内皮単球活性化タンパク質-2 (EMAP-2)、GM-CSF、IFN- γ 、IFN- α 、MIP-3 α 、SLC、MIP-3 β 、またはHLA-B7のようなMHC遺伝子である。このような免疫調節エフェクター分子の送達は、免疫系を調節し、宿主の抗腫瘍免疫の能力を高めるであろう。あるいは、B7.1およびB7.2等の共刺激分子、CD28およびCTLA-4両方に対するリガンドをコードする核酸分子も送達することにより、T細胞性免疫を増強することもできる。さらに別の免疫調節剤は、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼであり、これを腫瘍細胞に発現させると、補体性細胞死を可能とする。さらに、別の免疫調節剤は、腫瘍関連抗原、すなわち、対応する非癌性細胞には発現しないが、腫瘍細胞に特異的に発現する分子、または対応する非癌性細胞よりも高いレベルで、腫瘍細胞に発現する分子である。腫瘍関連抗原の例は、Kuby, Immunology, W. H.

Freeman and Company, ニューヨーク, NY, 第1版(1992)、pp. 515-520 (本明細書に参照により組み入れる)に記載されている。腫瘍関連抗原の他の例は、当業者には公知である。

[0149]

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、Flt-3リガンドまたはこれをコードする核酸である。別の実施形態では、二次エフェクター分子は、BRPである。

[0150]

具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子がTNFファミリーのメンバーのとき、TNFファミリーメンバーではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が抗血管新生因子のとき、抗血管新生因子ではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、細菌細胞膜を細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチドのとき、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチドではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が腫瘍抑制酵素のとき、腫瘍抑制酵素ではない。

[0151]

5. 3. 2. 腫瘍環境への抗腫瘍エフェクター分子の放出を促進する因子

本発明の他の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好ましくは、サルモネラベクターである本発明の弱毒化腫瘍標的細菌ベクターは、少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現するが、該二次エフェクター分子は、細菌細胞膜を透過可能にする、もしくは細胞外環境への細胞内成分の放出を増強する機能を果たし、これによって、一次および/または二次エフェクター分子の送達を増強する。このように、細菌細胞を透過可能にする、または放出を増強する二次エフェクター分子は、「放出因子」と呼ぶ。特定の実施形態では、放出因子は抗腫瘍活性も有するのが有利である。

[0152]

本発明の細菌ベクターにより発現させる放出因子は、修飾弱毒化腫瘍標的細菌に内在性のものでも、あるいは、外因性のもの(例えば、弱毒化腫瘍標的細菌にネイティブではない核酸によりコードされたもの)でもよい。放出因子は、プラスミドを含む核酸、または弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれた核酸により、コードすることができる。放出因子は、一次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。放出因子は、二次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。一実施形態では、放出因子は、Omp様タンパク質と融合させた一次エフェクター分子を含む融合タンパク質も発現する細胞内で発現させる。この実施形態では、放出因子の共発現により、細胞周辺腔からの融合タンパク質の放出を増強することができる。

[0153]

好ましい実施形態では、このような因子は、バクテリオシン放出タンパク質、すなわち、BRP (本明細書では、一般にBRPと呼ぶ)の1つである。本発明で用いるBRPは、限定するものではないが、クロアシンD F 13 プラスミド、コリシンE 1 ~ E 9 プラスミドの1つ、もしくはコリシンA、NまたはDプラスミドを含む当業者には公知の任意の供給源に由来するものでよい。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンD F 13 (pC10DF13 BRP) から成る。

[0154]

一般に、BRPは、45~52アミノ酸ペプチドであり、これは、初め、シグナルエンドペプチダーゼによって切断されないシグナル配列を含む前駆体分子(PreBRP)として合成される。BRP活性は、少なくとも部分的に、デクアゼンT耐性外膜ホスホリパーゼA (PldA) により媒介されると考えられ、通常、外膜リン脂質の分解の増加に関連している(BRPの概要については、van der Walら、1995、FEMS Microbiology Review 17:381-399を参照されたい)。機構に関して制限するわけではないが、BRPは、周辺細胞質成分の優先的放出を促進するが

、これより少ない程度での細胞質成分の放出も検出されている。適度に過剰発現させると、BRPは細胞膜を脆弱にし、細胞質成分の溶解および高放出を誘導する。さらに、BRPは、超高レベルで発現させると、このタンパク質が細菌細胞溶解を引き起こし、溶菌放出により細胞内容物を逃さすことができると考えられる。この実施形態で、BRP発現は、BRP活性（例えば、細胞内容物の放出）と関連すると考えられる。例えば、超高BRP活性により、実質的にすべての細菌の細菌細胞溶解が起こる。従って、本明細書で用いる「超高発現」は、実質的に全細菌の細菌細胞溶解を引き起こすBRPの発現レベルとして定義される。BRPを発現しない対照細菌と比較して、過剰のBRP活性は、細菌の溶解を必要とせずに、細菌内容物の部分的または増強された放出を伴う。従って、この実施形態では、BRPの適度な過剰発現とは、実質的にすべての細菌の細菌溶解を伴わずに、細胞質成分の放出が増加される発現レベルを意味する。本明細書で用いる実質的にすべての細菌とは、細菌の60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらにより好ましくは90%以上、最も好ましくは90~100%を意味する。

[0155]

本発明の具体的実施形態では、BRPタンパク質は、pC10DF13BRP突然変異体であり、その溶菌機能は、そのタンパク質放出機能とは分離されているため、細菌溶解なしに、タンパク質放出を増強する（van der Walら、1998、App. Env. Microbiol. 64:392-398）。この実施形態により、細菌ベクターからのタンパク質放出が長くなると共に、ベクターの頻繁な投与の必要性が減少する。別の具体的実施形態では、本発明のBRPは、C末端を短くしたpC10DF13BRP 20であり、これは、タンパク質放出に加えて、細胞溶解を引き起こす（Lairinkら、1989、J. Bacteriol. 171:2673-2679）。

[0156]

本発明の別の実施形態では、増強された放出系は、ボーリントンタンパク質の過剰発現を含む：例えば、Sugawara, E. およびNikaido, H., 1992, J. Biol. Chem. 267:2507-11を参照のこと。

[0157]

特定の実施形態では、本発明の細菌ベクターによりBRPを発現させる場合、BRPは、修飾弱毒性腫瘍標的細菌に内在性でも、あるいは、外因性のもの（例えば、弱毒性腫瘍標的細胞にネイティブではない核酸によりコードされたもの）でもよい。BRPは、プラスミドを含む核酸により、または弱毒性腫瘍標的細胞のゲノムに組み込まれたタンパク質核酸によりコードすることができる。また、BRPは、一次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。さらに、BRPは、二次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。一実施形態では、BRP様タンパク質は、Omp様タンパク質と融合させたエフェクター分子を含む融合タンパク質も発現する細胞内で発現させる。この実施形態では、BRPの共発現により、融合タンパク質の放出を増強することができる。

[0158]

本発明の好ましい具体的実施形態では、BRPをコードする核酸は、コリシンプラスミド 40によりコードされる。本発明の別の実施形態では、BRPコード核酸は、ネイティブのBRPプロモーターの制御下で発現させるが、その際のプロモーターは、その正常な宿主（BRPの場合、Enterococcus cloacae）においてストレス（例えば、紫外線等のDNA損傷を起こす条件）に応答するSOSプロモーターであり、しかも、サルモネラにおいて部分的に構成的である。好ましい実施形態では、BRPコード核酸は、pepTプロモーターの制御下で発現させるが、その際、該プロモーターは、腫瘍環境の嫌気性性質に応答して活性化する（例えば、Lombardoら、1977、J. Bacteriol. 179:1909-17）。

[0159]

あるいは、プロモーターは、Tn10トランスポソンのtetプロモーター等の抗生物質 50

誘導プロモーターであることができる。好ましい実施形態では、tetプロモーターは、単量体 (singlemer) であり、該単量体は、ドキシサイクリンおよびアンヒドロテトラサイクリン等のテトラサイクリンまたはその類似体の存在に、感応的に応答し、遺伝学的に安定したオン・オフスイッチを提供する。別の実施形態では、tetプロモーターは、多量体化 (例えば、3倍) する。このような多量体は、テトラサイクリンの存在に段階的に応答し、エフェクター分子レベルの制御をより操作しうる系を提供する。次に、本発明の弱毒性菌株の細菌で治療している被験者に、適した用量のテトラサイクリンを投与することにより、プロモーター活性を誘導する。tet誘導性発現系は、当初、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (FaryarおよびGatz, 1992, *Current Genetics* 21:3 45-349) および哺乳動物細胞 (LangおよびFeingold, 1996, *Gene* 168:169-171) 等の真核細胞系について記載されていたが、近年の研究で、細菌細胞までその適用性が広がっている。例えば、Stiegerら (1999, *Gene* 226:243-252) は、tetプロモーターに機能的に連結させたtet誘導における、ホタル (firefly) ルシフェラーゼ遺伝子の80倍誘導を明らかにした。このプロモーターの利点は、非常に低レベルのテトラサイクリン、すなわち、抗生物質活性に必要な用量の約1/10で、誘導される点である。

[0160]

5. 4. 誘導体と類似体

本発明は、さらに、誘導体をコードまたは送達するように修飾された細菌バクテラを含む。この誘導体として、限定するものではないが、一次および/または二次エフェクター分子、もしくはこれをコードする核酸の断片、類似体、あるいは変異型が挙げられる。誘導体、類似体または変異型は、機能的に活性であり、例えば、全長の、野生型エフェクター分子に関連する1以上の機能活性を示すことができる。一例として、所望の治療特性を有するこのような誘導体、類似体または変異型を用いて、腫瘍成長または腫瘍細胞の分散 (転移) を阻害することができる。エフェクター分子の誘導体または類似体は、本明細書に記載したものや、当業者には公知の方法により、所望の活性について試験することができる。

[0161]

特に、野生型エフェクター分子と同じ、もしくはこれより高い抗腫瘍機能を有する分子を提供する置換、付加 (例えば、挿入) または欠失により、エフェクター分子コード配列を変更することにより、変異型を作製することができる。例えば、本発明の変異型としては、限定するものではないが、一次アミノ酸配列として、エフェクター分子のアミノ酸配列の全部または一部を含むものが挙げられ、これには、機能的に同等のアミノ酸残基を配列内で、サイレント変化を起こす残基で置換した、改変された配列がある。すなわち、改変された配列は、少なくとも1の保守的置換を有する。

[0162]

哺乳動物に由来する一次または二次エフェクターコード核酸のいずれかを改変して、当業者には公知の方法により、細菌コドン使用頻度を用いることができる。好ましいコドン使用頻度は、下記に例示されている: *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, Inc., および John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク, および Zhangら, 1991, *Gene* 105:61-72。

[0163]

具体的実施形態では、一次または二次エフェクター分子の誘導体、類似体または変異型は、一次または二次エフェクター分子、またはその断片をコードするヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。ここで、ハイブリダイゼーションは、ストリクセンツナ条件下で、例えば、約45℃で6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) 中でフルクサーに結合させたDNAとハイブリダイズさせた後、約50~65℃で0.2xSSC/0.1%SDS中で1回以上洗浄することにより行う。または、

(45)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

高度にストリンジェントな条件下で、例えば、約45℃で6 x SSC中でフィルターに結合させた核酸とハイブリダイズさせた後、約68℃で0.1 x SSC/0.2%SDS中で1回以上洗浄することにより実施する。あるいは、当業者には公知の他のストリンジェントな条件下で実施することができる(例えば、Ausubel, F. M. ら、編、1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., および John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク, pages 3.1~6.3.6および2.10.3)。

[0164]

一次もしくは二次エフェクター分子の誘導体または類似体としては、限定するものではないが、一次もしくは二次エフェクター分子またはその断片に実質的に相同な領域を含む分子(例えば、様々な実施形態における、挿入または欠失を一切含まない同じサイズのアミノ酸配列に対して、あるいは、アラインメントが当業者には公知のコンピュータ同源性プログラムにより実施されたアラインメント配列と比較して、少なくとも60%または70%または80%または90%または95%同一性)、あるいは、そのコード核酸で、高ストリンジェンシー、中ストリンジェンシーまたは低ストリンジェンシー条件下で、エフェクター分子タンパク質エフェクター分子コード配列にハイブリダイズすることができる分子が挙げられる。

[0165]

例えば、一次エフェクター分子の配列と他の既知配列間の、2つのアミノ酸配列または2つの核酸の同一性百分率を決定するために、最適な比較目的に合わせて配列をアラインメントする(例えば、第1アミノ酸または核酸配列にギャップを導入して、第2アミノ酸または核酸配列との最適アラインメントを達成することができる)。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1配列における位置が、第2配列における対応位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合には、分子は、その位置で同一である。2つの配列間の同一性百分率は、配列が共有する同一位置の数の関数である(すなわち、%同一性=同一位置の数#/位置の総数#(例えば、重複位置)×100)。一実施形態では、2つの配列は、同じ長さである。

[0166]

2つの配列間の同一性百分率は、数学アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列の比較に用いられる数学アルゴリズムの好ましい非制限的例は、KarlinおよびAltschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268のアルゴリズム(KarlinおよびAltschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877に記載されているように修正された)である。このようなアルゴリズムは、Altschulら, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索と、NBLASTプログラム、スコア=100、語長=12を用いて実施することにより、本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索と、XBLASTプログラム、スコア=50、語長=3を用いて実施することにより、本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギャップアラインメントを得るためには、Altschulら, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402に記載されているように、ギャップBLASTを用いることができる。あるいは、PSI-BLASTを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施してもよい(同上)。BLAST、ギャップBLAST、およびPSI-BLASTプログラムを用いる場合には、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを用いることができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照のこと。配列の比較に用いられる数学アルゴリズムの別の好ましい非制限的例は、MyersおよびMil

ierのアルゴリズム、CABIOS (1989)である。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部である、ALIGNプログラム (バージョン2.0)に組み込まれている。ALIGNプログラムを使用してアミノ酸配列を比較する場合には、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティー、および、4のギャップペナルティーを用いることができる。配列分析のためのさらなるアルゴリズムは、当業者には公知であり、次のものが挙げられる: TorellisおよびRobotti, 1994, Comput. Appl. Biosci., 10:3-5に記載されたADVANCEおよびADAM: PearsonおよびLipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8に記載されたFASTA。FASTAでは、ktupが、検索の鋭敏性および速度を設定する制御オプションである。ktup=2であれば、比較している2つの配列における類似領域は、アラインメント済残基対を調べることによりみつけれられる。また、ktup=1であれば、単一のアラインメント済アミノ酸を調べる。ktupは、タンパク質配列の場合は、2または1に、DNA配列の場合は、1~6に設定することができる。ktupが指定されていない場合には、デフォルトは、タンパク質については2、DNAについては6である。FASTAパラメーターのさらに詳細な説明については、<http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/fasta.1.html#sect2>を参照されたい。尚、この内容は、本明細書に参照により組み入れる。

[0167]

あるいは、タンパク質配列アラインメントは、Higginsら、1996, Methods Enzymol. 266:383-402に記載されているCLUSTAL Wアルゴリズムを用いて実施することができる。

[0168]

2つの配列間の同一性百分率は、ギャップのあるなしに拘わらず、前述したものと同様の技法を用いて決定することができる。同一性百分率を計算する際には、正値に同じものだけを数数する。

[0169]

一次エフェクター分子もしくは二次エフェクター分子、またはその誘導体または類似体は、当業者には公知の様々な方法により生成することができる。これらを生産するための操作は、核隠またはタンパク質レベルで行うことができる。例えば、エフェクター分子をコードする、クローニングされたエフェクター分子コード配列は、当業者には公知の多数の戦略のいずれかによって修飾することが可能である (Sambrookら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク)。該配列は、制限エンドヌクレアーゼを用いて、適切な部位で切断し、次いで、所望であれば、さらに酵素による修飾を施し、単離した後、*in vitro*で連結することができる。一次または二次エフェクター分子の誘導体または類似体はコードする修飾エフェクター分子の生成の際、所望の一次または二次エフェクター分子活性がコードされるエフェクター分子コード配列領域において、修飾エフェクター分子コード配列が、翻訳停止シグナルにより中断されない状態で、ネイティブタンパク質と同じ翻訳リーディングフレーム内に残ることを確実にするよう注意しなければならない。

[0170]

さらに、エフェクター分子をコードする核隠を*in vitro*または*in vivo*で突然変異させることにより、翻訳、開始、および/または終結配列を形成および/または破壊する、あるいは、コード領域に変異を発生させる、および/または新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成する、もしくは既存のものを破壊することにより、*in vitro*修飾をさらに促進することができる。好ましい具体的実施形態では、エフェクター分子コード核隠を突然変異させることにより、例えば、さらに強力な変異型を生成する。当業

者には公知の任意の突然変異誘発技法を用いることができ、この技法には、限定するものではないが、下記のもの挙げられる：化学的突然変異誘発、*in vitro*部位指定突然変異誘発（Hutchinsonら、1978, J. Biol. Chem. 253: 6551）、TAB（登録商標）リンカー（Pharmacia）の使用、突然変異を含むプライマーを用いるPCR等。好ましい実施形態では、エフェクター分子の1以上の指定非必須アミノ酸残基の位置において、保存的アミノ酸置換物を作製する。「保存的アミノ酸置換物」とは、アミノ酸残基を、類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸残基で置換したものを意味する。類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当業界で定義されている。これらのファミリーとしては、下記のものが挙げられる：塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 枝分かれ側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）をそれぞれ有するアミノ酸。あるいは、突然変異は、例えば、飽和突然変異誘発により、コード配列の全部または部分に沿って、ランダムに導入することができ、こうして得られた突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングすることにより、活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異誘発の後、コードタンパク質を発現させ、該タンパク質の活性を決定することができる。

【0171】

別の実施形態では、プロテアーゼ切断部位を含むように、本発明のエフェクター分子または融合タンパク質を構築する。

【0172】

5. 5. 融合タンパク質

特定の実施形態では、本発明は、融合タンパク質（例えば、別のタンパク質と共有結合している）として構築される一次または二次エフェクター分子を提供する。本発明は、このような融合タンパク質をコードする核酸を提供する。本発明の特定の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸を、適したプロモーターに機能的に連結する。

【0173】

特定の実施形態では、エフェクター分子は、別のタンパク質のアミノ酸配列とのペプチド結合を介して、そのアミノまたはカルボキシー末端に結合したエフェクター分子もしくはその断片（好ましくは、該エフェクター分子の少なくともドメインもしくはモチーフ、または、該エフェクター分子の少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、少なくとも75、もしくは少なくとも100のアミノ酸からなる）を含むキメラタンパク質または融合タンパク質として構築される。特定の実施形態では、融合物は、機能的に活性である異種ポリペプチドまたはその断片の少なくとも2、少なくとも6、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、少なくとも75、もしくは少なくとも100の連続したアミノ酸を含む。一実施形態では、このようなキメラタンパク質または融合タンパク質は、別のタンパク質のコード配列にフレーム内結合した一次エフェクター分子をコードする核酸（例えば、TNPコード配列、抗血管新生因子コード配列、腫瘍抑制剤コード配列、もしくは細胞傷害性ポリペプチドコード配列）の組換え発現により生成する。このようなキメラタンパク質は、当業者には公知の方法により、適正なコードフレーム内で、所望のアミノ酸配列をコードする適切な核酸配列を互いに連結した後、当業者には公知の方法で最適な発現運搬体にキメラ産物を発現することにより、作製することができる。任意の異種ポリペプチドコード配列と融合させたエフェクター分子をコードする核酸部分を含むキメラ核酸を構築してもよい。具体的実施形態は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、もしくは少なくとも100のアミノ酸からなる一次または二次エフェクター分子の断片、あるいは、全長一次または二次エフェクター分子の1以上の機能活性を示す断片を含むキメラタンパク質に關す

(48)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

る。

【0174】

具体的実施形態では、融合タンパク質は、ヘキサヒスチジンタグ等のアフィニティータグ、または精製、単離、同定もしくは発現アッセイで用いることができるその他のアフィニティータグを含む。別の具体的実施形態では、融合タンパク質は、メタルプロテアーゼまたはセリン切断部位等のプロテアーゼ部位を含む。この実施形態では、腫瘍部位で活性であるプロテアーゼに対応するプロテアーゼ部位を本発明の融合タンパク質中に構築するのが好ましい場合もある。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、Omp様タンパク質、もしくはその断片（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、多重膜貫通ドメイン、あるいは、これらの組合せ；以下の第3、1節、Omp

【0175】

好ましい実施形態では、本発明のエフェクター分子（一次または二次）は、外膜タンパク質（Omp様タンパク質）を含む融合タンパク質として発現させる。細菌外膜タンパク質は、細菌外膜の膜内タンパク質であり、多重膜貫通（multiple membrane-spanning）ドメインを有し、多くの場合、1以上の脂質成分に結合している。外膜タンパク質は、初め、タンパク質を膜に向かわせるアミノ末端シグナルペプチドを有する前駆体の形態で発現し、その際に、シグナルペプチドをシグナルペプチダーゼにより切断して、成熟タンパク質を生成する。一実施形態では、エフェクター分子は、Omp様タンパク質との融合タンパク質として発現させる。この実施形態では、一次エフェクター分子は、細菌の外膜への送達が増強されている。機構に拘らず制限するわけではないが、本発明者は、Omp様タンパク質が、外膜に対するエフェクター分子のアンカーまたは連結鎖（tether）として働く、あるいは、細菌外膜にタンパク質を局在化させる役割を果たすと考えられる。一実施形態では、Omp様タンパク質とのエフェクター分子との融合を用いて、周辺細胞質へのエフェクター分子の局在化を増強する。別の実施形態では、Omp様タンパク質とエフェクター分子の融合を用いて、エフェクター分子の放出を増強する。具体的実施形態では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、IamB、βラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナゼ、ペプチドグリカン関連リポタンパク質（PAL）、FepA、FhaA、NmpA、NmpB、NmpC、もしくは主要な外膜リポタンパク質（LPP等）の少なくとも一部である。本発明の特定の実施形態では、シグナル配列は、疎水性を高めて構築する（例えば、疎水性アミノ酸（例えば、ロイシン）への、シグナル配列内のアミノ酸の挿入または置換による）。実施例については、以下の第7、1〜7、4節を参照のこと。

【0176】

本発明の別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、タンパク質分解切断部位を含む。タンパク質分解切断部位は、エフェクター分子に内在的またはOmp様タンパク質に内在的である、あるいは、タンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。特定の具体的実施形態では、本発明のOmp様タンパク質は、別々のタンパク質に由来する構造エレメントを含むハイブリッドOmpである。

【0177】

上記実施形態の態様例では、Omp様タンパク質はOmpAである。具体的Omp様タンパク質の構造的立体配置に留意しながら、OmpA様融合タンパク質の構築に用いた同じ原理を他のOmp様タンパク質に適用することができる。

【0178】

例えば、ネイティブOmpAタンパク質は、該タンパク質の170アミノ酸N末端ドメイン内に8つのアンチパラレル膜貫通β鎖を含む。膜貫通ドメインの各対の間には、膜貫通ドメインの挿入方向に応じて、細胞外または細胞内ループがある。C末端ドメインは、155アミノ酸からなり、これらは、細胞内に位置し、恐らく、細胞周辺腔を占めるペプチドグリカンと接触していると思われる。OmpA融合タンパク質の生成を促進する発現ベ

クターが作製されている。例えば、Hobomら(1995, Dev. Biol. S
trand, 84:255-262)は、OmpAオープンリーディングフレームを含
むベクターを開発しており、これは、第3または第4細胞外ループをコードする配列内に
リンカーが挿入されている。該ループにより、選択した異種タンパク質のフレーム内挿入
が可能になる。

[0179]

本発明の一実施形態では、一次エフェクター分子を含むOmpA融合タンパク質部分は、
周辺細胞質において発現を増強させた。該実施形態の一態様では、融合タンパク質は、成
熟前に、シグナル配列、または、一次エフェクター分子もN末端に位置するOmpAの少
なくとも1の膜貫通ドメインが続くシグナル配列を含む。シグナル配列は切断され、成熟
タンパク質から欠失している。上記実施形態の別の態様では、一次エフェクター分子は、
OmpA融合タンパク質のN末端にあるため、融合タンパク質が安定している限り、使用
したOmpAの膜貫通ドメインの数は、一次エフェクター分子の位置決定にとって重要で
はなくなる。上記実施形態のさらに別の態様では、一次エフェクター分子は、OmpAの
NおよびC末端ドメインの間に配置し、これによって、可溶性周辺細胞質タンパク質は、
周辺細胞質内の周辺細胞質プロテアーゼによる切断の際に、一次エフェクター分子を含有
する。この実施形態の特定の態様では、周辺細胞質一次エフェクター分子を発現する細菌
ベクターは、BPRも共発現することにより、細菌細胞からのエフェクター分子の放出を
増強する。

[0180]

本発明の別の実施形態では、一次エフェクター分子を含むOmpA融合タンパク質部分は
、細胞外細胞表面にある。該実施形態の一態様では、融合タンパク質は、一次エフェク
ター分子のN末端に位置するOmpAの偶数または奇数の膜貫通ドメインを含む。上記実施
形態の別の態様では、一次エフェクター分子をOmpAの2つの細胞外ループ間に配置し
て、細菌細胞による胞吐細胞への表示を達成する。具体的実施形態では、本発明は、細菌
細胞外表面に位置するエフェクター分子融合タンパク質の発現プラスミドを提供する。例
えば、Trec(1pp)ompAと称されるプラスミドは、切断型ompA膜貫通配列に
融合したtrecプロモーター駆動リポポリタンパク質(1pp)アンカー配列を含む。別
の例として、上記プラスミドは、TrecompAと称し、trecプロモーター駆動omp
Aコードシグナル配列を含む。このようなプラスミドは、本発明の1以上のエフェクター
分子をコードする核酸を含むように構築することができる。

[0181]

場合に応じて、エフェクター分子は、腫瘍に豊富に存在するメタロプロテアーゼまたはセ
リンプロテアーゼの共通切断部位に先行されるか、もしくは該部位と隣接させることによ
り、腫瘍環境にエフェクター分子の放出を起こす。一次エフェクター分子が、プロテアー
ゼ切断部位に先行されるか、隣接させるかは、それぞれ、融合タンパク質内の末端に位置
するか、内部に位置するかによる。

[0182]

同様の融合タンパク質は、OmpAに関して前述した戦略を使用し、任意のOmp様タン
パク質と構築することができる。このような融合タンパク質の構築に際して、当業者には
明らかなように、エフェクター分子に融合させるOmp様タンパク質部分の選択は、エフ
ェクター分子の発現のために望ましい位置(例えば、周辺細胞質に、細胞外に、膜に結合
して等)に応じて異なる。一次エフェクター分子に関して、本明細書に記載したこのよ
うなタンパク質構築は、二次エフェクター分子に対しても適切である。

[0183]

好ましい実施形態では、エフェクター分子はフェリーペプチドに融合させる。融合タン
パク質に用いられるフェリーペプチドは、その生成または導入の拡散範囲(diffusi
on limits)内で、実質的にあらゆる細胞へ、目的とするポリペプチドまたはペ
プチドの送達を促進することが明らかにされている(例えば、Bayley, 1999
、Nature Biotechnology 17:1066-1067; Ferna

andezら, 1998, *Nature Biotechnology* 16:418-420; および Derossiら, 1998, *Trends Cell Biol.* 8:84-87)。従って、弱毒化腫瘍標的細菌が、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む融合タンパク質を発現するように、該細菌を操作することにより、エフェクター分子が腫瘍細胞によって取り込まれる能力を増強する。具体的実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む融合タンパク質をコードする核酸を発現するように操作する。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。これらの実施形態によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。フェリーペプチドの例として、限定するものではないが、HIV TATタンパク質に由来するペプチド、アンテナペペディンAホモドメイン（ペネトラキシン）、カボジ繊維芽細胞増殖因子（FGF）膜移行性配列（MTS）、単純ヘルペスウイルスVP22、ポリヒスタジン（例えば、ヘキサヒスタジン；6H）、ポリリシン（例えば、ヘキサリシン；6K）およびポリアルギニン（例えば、ヘキサアルギニン；6R）（例えば、Blankeら, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8437-8442）が挙げられる。

[0184]

別の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、シグナルペプチド、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む。この実施形態の具体的態様では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。この態様によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。

[0185]

別の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍癌に送達するための、シグナルペプチド、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む。具体的実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。この態様によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。

[0186]

非制限的例として、コリシン活性は、HIV TAT、単純ヘルペスウイルスVP22、アンテナペペディン、6H、6Kおよび6Rに由来する取り込み用ペプチドを添加することにより増強することができる。融合は、C末端、N末端または内部のいずれにおいても可能である。内部での融合は、N末端シグナル配列切断ペプチドの後に融合が続く場合、特に好ましい。融合タンパク質は、さらに、OmpA等のN末端シグナル配列、またはhlyA等のC末端シグナル配列を含む。

[0187]

好ましい実施形態では、エフェクター分子を毒素の送達部分に融合させる。様々な毒素が、自己送達能力を有することで知られており、その際、毒素の一部分が、毒素の第2部分の送達因子として働く。例えば、Ballardら（1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12531-12534）は、哺乳動物細胞の細胞質ゾルコンパートメントへの致死因子（LF）および浮腫因子のエントリーを媒介する炭疽（anthrax）保護剤（PA）が、LFの切断型（LFn; 255アミノ酸残基）へのタンパク質融合物のエントリーも媒介できることを明らかにした。従って、本発明のエフェクター分子は、細胞の外部で機能するものを除き、LFn、またはその他の毒素系（限定するものではないが、ジフテリア毒素A鎖残基1-193等）（Blankeら、1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8437-8442）、コレラ毒素、ペロ毒素、大腸菌熱不安定性毒素（LT）、大腸菌熱安定性毒素（ST）、腸毒素、エンテロトキシ、細胞毒素、EaggEC安定性毒素1（EAST）、CNF、細胞致死性膨脹毒素、 α 溶血素、 β 溶血素、およびSheA溶血素に融合

することができる（詳しくは、例えば、O' BrienおよびHolmes, 1996, Protein toxins of *Escherichia coli* and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt (編), ASM Press, ワシントンD. C., pp2788-2802参照）。具体的実施形態では、一次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。

【0188】

細菌内で発現させるための融合タンパク質の構築は、当業者には公知であり、このような方法は、本発明の範囲に含まれる（例えば、Makrides, S., 1996, Microbiol. Revs 60:512-538を参照。尚、この文献は、参照により本明細書にその全文を組み入れる）。

【0189】

5. 6 発現運搬体

本発明は1以上の一次エフェクター分子および1以上の任意の二次エフェクター分子をコードするよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明はプラスミドまたはトランスフェクト可能な核酸にコードされるエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌において2以上のエフェクター分子（例えば、一次または二次）が発現される場合には、エフェクター分子は同一のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよいし、または2以上のプラスミドもしくは核酸分子にコードされていてもよい。本発明はまた細菌ゲノムに組み込まれた核酸分子にコードされるエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。組み込まれるエフェクター分子はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌の内生のものであってもよいし、またはエフェクター分子をコードする核酸分子が弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれるように、弱毒化腫瘍標的細菌に導入してもよい（例えば、プラスミド、トランスフェクト可能な核酸、トランスポゾンなどのようなエフェクター分子をコードする核酸の導入による）。本発明の好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。本発明は適当なプロモーターに機能的に連結されている、エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。エフェクター分子をコードする核酸分子に機能的に連結されているプロモーターは同種（すなわち、天然のもの）または異種（すなわち、エフェクター分子をコードする核酸分子に対して天然のものでない）であってもよい。

【0190】

本発明のエフェクター分子をコードするヌクレオチド配列またはその機能的に活性な類似体もしくは断片もしくはその他の誘導体は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のための必須エレメントを含む適当な発現運搬体、例えばプラスミドに挿入してもよい。必須転写および翻訳シグナルはエフェクター分子および/またはそのランギン領域によって供給されてもよい。あるいは、発現運搬体は、DNA操作の分野で公知の種々の方法の1つを用いて、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、好適な翻訳開始および終結シグナルとともに、機能性プロモーターと機能可能な読み取り相で挿入することによって構築する。概論として、Sambrookら, 1989, Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelら, 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, New York, NYを参照。これらの方法はin vitro組換えDNAおよび合成技術およびin vivo組換え（遺伝子組換え）を含み得る。本発明は適当なプロモーターに機能的に連結されている、エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。

【0191】

本発明はまた1以上の融合タンパク質および1以上の任意のエフェクター分子をコードするよう改変された弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。本発明はプラスミドまたはトランスフ

エクト可能な核酸にコードされる融合タンパク質を含んでなる弱毒性腫瘍標的細菌を提供する。サルモネラ菌などの弱毒性腫瘍標的細菌において2以上の融合タンパク質および/またはエフェクター分子(例えば、一次または二次)が発現される場合には、融合タンパク質および/もしくはエフェクター分子は同一のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよいし、または2以上のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよい。本発明はまた細菌ゲノムに組み込まれた核酸にコードされる融合タンパク質を含んでなる弱毒性腫瘍標的細菌も提供する。本発明はまた適当なプロモーターに機能的に連結されている融合タンパク質をコードする核酸分子も提供する。本発明の融合タンパク質をコードするスクレオチド配列は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のための必須エレメントを含む適当な発現運搬体、例えばプラスミドに挿入してもよい。

[0192]

本発明のある特定の実施形態では、本発明の発現運搬体はプラスミドである。当業者には多数の好適なプラスミドが知られており、また市販のものを入手して本発明の組換え構築物を作製することもできる。

[0193]

かかる市販のプラスミドとしては、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) および GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) が挙げられる。これらのpBR322「基幹」部分を適当なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせる。pBR322は低コピー数プラスミドであると考えられている。高レベルの発現を望む場合には、プラスミドは高コピー数プラスミド、例えば、pUC基幹を含むプラスミドであってもよい。pUCプラスミドとしては、限定されるものではないが、pUC19 (例えば、Yanisch-Perronら, 1985, Gene 33:103-119参照) および pBluescript (Stratagene) が挙げられる。

[0194]

以下のプラスミドが例として挙げられ、本発明の方法とともに使用できる。細菌性: pBS, phagescript, phiX174, pbluescriptSK、pBSKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene); pTrec99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)。pBR322「基幹」を含む市販のプラスミド、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) および GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) も使用できる。これらを適当なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせる。pCET、pTS (本明細書の第6節に記載されるような)。

[0195]

本発明の特定の実施形態では、エフェクター分子をコードするプラスミドは本明細書の第6節に記載されるpTS-TNF- α プラスミド、pTS-BRPプラスミド、またはpTS-BRPTNF- α プラスミドである。

[0196]

本発明の特定の実施形態では、ompAシグナル配列および一次エフェクタータンパク質を含んでなる、細胞膜周辺腔への分泌のための本発明の融合タンパク質はプラスミドpIN-III-ompA-Hindにコードされており、これは一次エフェクター分子のコード配列がクローニングされ得るリンカー配列の上流にompAシグナル配列をコードするDNA配列を含む。好ましい特定の実施形態では、pIN-III-ompA-Hindベクターのlac誘導性プロモーターをpепTまたはtetプロモーターで置換する(Rentier-Delrueら(1988), Nuc. Acids Res. 16:8726参照)。

[0197]

本発明はまたエフェクター分子のトランスポゾン媒介性染色体組込みを提供する。本発明の方法には、エフェクター分子をコードする核酸がトランスポゾンカセット中に構築され

得る限り、当技術分野で公知のいずれのトランスポゾンプラスミドを用いてもよい。例えば、本発明はトランスポゾンまたはミニトランスポゾンおよびMCSを含んでなるトランスポゾンプラスミドを提供する。

【0198】

本発明のある実施形態では、本発明のプラスミドはトランスポゾンプラスミドである、すなわち、注目されるエフェクター分子をコードする配列が挿入されたトランスポゾンを含んでなる。トランスポゾンプラスミドはトランスポゾンカセットを含み、このカセットが細菌ゲノムに組み込まれる。従って、エフェクター分子またはその融合タンパク質をコードする核酸をトランスポゾンカセットに挿入する。このようにして、トランスポゾン挿入によりそのカセットが細菌ゲノムに組み込まれる。エフェクター分子のコード配列はプロモーターに機能的に連結していてもよいし、またはプロモーターなしでもよい。後者の場合には、選択マーカーの発現は細菌ゲノムへのトランスポゾン挿入部位にあるプロモーターによってなされる。トランスポゾンが挿入された細菌のコロニーを本発明の要件に一致する発現レベルについて、例えば、腫瘍の細胞傷害性、静止、退縮を増強するのに十分なレベルのサイトカインを発現するものをスクリーニングする。

【0199】

ある実施形態では、トランスポゾンプラスミドがトランスポゾンの他に、トランスポゾンの逆位反復配列の外側に、トランスポゾンとともに運ばれることなく、トランスポゾンの細菌ゲノムへの挿入を触媒するトランスポザーゼ遺伝子を含んでなり、そのようにして安定なトランスポゾン挿入を有する細菌菌株を作製する。

【0200】

本発明に利用されるトランスポゾンとしては、限定されるものではないが、Tn7、Tn9、Tn10およびTn5が挙げられる。好ましい実施形態では、トランスポゾンプラスミドはTn10挿入エレメントの外側に位置するアンピシリン耐性遺伝子を有するpNK2883 (ATCC) であり、1以上のエフェクター分子をコードする核酸が2個のTn10挿入エレメントの間（例えば、トランスポゾンカセット内）に挿入されている。好ましくは、構築物はその他のエレメントをコードするさらなる配列が2個のTn10挿入エレメントの間に挿入されるように作製する。特定の実施形態では、かかるエレメントは所望により（1）プラスミドを含む細菌の陽性選択のための選択マーカー（例えば、SerC、AroAなど）のプロモーターのないコピー；（2）BRP遺伝子、（3）1以上の一次エフェクター分子（TNF- α 、またはその融合タンパク質、例えば、Omp-A-TNF- α 融合物など）をコードする核酸に機能的に連結されたエフェクター分子（trcなど）のプロモーター、（4）1以上のエフェクター分子をコードする核酸のターミネーターを含んでもよい。

【0201】

ある実施形態では、必要に応じてプラスミドを操作し、プラスミドにコードされるアンピシリン耐性特性を用いて所望の構築物を有するクローンを選抜した後、プラスミドの喪失によって抗生物質選択が除去され、ヒト患者への投与のための染色体トランスポゾン挿入部分を有する菌株を選択する（例えば、選択培地にプレーティングすることによる）。

【0202】

もう1つの特定の実施形態では、標的特異性が変化したトランスポザーゼ遺伝子およびプロモーターのないserc遺伝子のコード配列およびMCSを含むミニトランスポゾンを含んでなるプラスミドpTISを用いる。もう1つの特定の実施形態では、標的特異性が変化したトランスポザーゼ遺伝子およびプロモーターのないserc遺伝子のコード配列、およびアルキル化剤誘導性バクテリオシン放出因子およびMCSを含むミニトランスポゾンを含んでなるプラスミドpTIS-BRPを用いる。

【0203】

好ましい実施形態では、トランスポゾン媒介性染色体組込み体の選抜のためのトランスポゾンプラスミドは以下を含んでなる：

a) トランスポゾン挿入配列の外側に（例えば、トランスポゾンカセットの外側に）位置

するトランスポゾン切り出しおよび組み込みのためのトランスポザゼ遺伝子；

b) 細菌菌株において欠失した選択遺伝子（例えば、*serC*）に相当する野生型コード配列ならびにリボソーム結合部位および野生型遺伝子のターミネーター（ただし、プロモーターは欠く）。この配列は好ましくは左側の T N 1 0 トランスポゾン挿入配列の直後に位置する；

c) 所望により、右側および左側の挿入配列の間が放出増強核酸（例えば、BRP）をコードする核酸配列である；ならびに

d) 右側および左側の挿入配列の間に位置し、プラスミド内に唯一の制限部位を複数含む、エフェクター分子の組み込みのためのマルチブルクロニング部位（MCS）。MCS は好ましくは放出増強核酸の直後（使用する場合には）、かつ、右側の T N 1 0 挿入配列の直前に位置する。

【0204】

もう1つの実施形態では、宿主染色体へのエフェクター分子のランダムな組み込みに起因する遺伝子破壊により、エフェクター挿入の遺伝子位置の適性を確認する。

【0205】

さらにもう1つの実施形態では、発現運搬体は抗生物質選抜を必要としない安定な、すなわち、自己維持される染色体外プラスミドである。限定するものではないひとつの実施例では、自己維持型発現運搬体はサルモネラ病原性プラスミドである。

【0206】

例えば、本発明のある実施形態では、プラスミド選抜系をサルモネラ菌などの細菌が失っている機能を提供することで維持し、それに基づいて機能を有するサルモネラ菌をそうでないものから選抜することができる。ある実施形態では、本発明のサルモネラ菌は栄養要求性変異菌株であり、発現プラスミドは変異株すなわち合成酵素機能が欠けたものを提供する。発現プラスミドを含むサルモネラ菌は細胞を所望の細胞、すなわち、発現プラスミドを含むもののみが代謝できる栄養素を欠く増殖培地で増殖させることで選抜できる。この実施形態の非常に好ましい態様では、最も好ましくは *asd* 遺伝子の欠失によって、本発明のサルモネラ菌は DAP（メソジアンモノヒメリン酸）を不可避に要求する。DAP はグラム陰性菌の周辺細胞質に存在するペプチドグリカンの構成要素であり、完全な細菌外膜に必要である。DAP がいない細菌細胞は外膜が完全でないために溶解してしまう。 *asd*（ β -アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ）遺伝子は DAP 合成経路中の酵素をコードしている。 *asd* 機能を欠くグラム陰性菌は培養培地に DAP を供給することで増殖させられる。同種または異種プロモーターに機能しうる形で連結した *asd* 遺伝子配列を保持するプラスミド、例えば、本発明の発現プラスミドは DAP の不在下で *asd* 活性を欠くグラム陰性菌を増殖させることで選抜できる（例えば、Curtiss, I II の米国特許第 5, 840, 483 号参照）。

【0207】

その他の非抗生物質選抜系が当技術分野で知られており、かつ、本発明の範囲内にある。例えば、安定な毒素とあまり安定でない抗毒素を含んだプラスミドを利用する選抜系を使用してかかるプラスミドを維持する細菌を選抜してもよい。

【0208】

もう1つの実施形態では、発現運搬体は非抗生物質的方法で選抜できる染色体外プラスミド、例えば、コリシンプラスミドである。本明細書において、コリシンプラスミドは最低限コリシン毒素および抗コリシンをコードし（コリシン毒素は抗コリシンよりもより安定である）、その結果、コリシンプラスミドを欠く細菌はいずれもコリシン毒素が継続する結果として死滅する。好ましい実施形態では、コリシン毒素は *ColE3* の大サブユニットであり、抗コリシンは *ColE3* の小サブユニットである。

【0209】

本発明のその他の実施形態では、発現運搬体は λ ベクター、より詳しくは溶原性 λ ベクターである。好ましい実施形態では、 λ ベクターを含んだ細菌宿主は 30℃ では機能的であるが 37℃ ではそうでない温度感受性 λ リプレッサーをさらに含んだ。従って、

細菌宿主は30℃で細菌細胞にとって毒性であり得る一次および/または二次エフェクター分子を発現せずに *in vivo* で増殖させ操作できる。細菌菌株の患者への導入の際には、 λ リプレッサは正常な体温により不活性化され、一次エフェクター分子および所望により二次エフェクター分子の発現が活性化される。

[0210]

エフェクター分子または融合タンパク質をコードする核酸配列の発現は、エフェクター分子が組換えDNA分子で形質転換された細菌において発現されるよう第2の核酸配列によって調節できる。例えば、エフェクター分子の発現は当技術分野で公知のいずれかのプロモーター/エンハンサーエレメントによって制御できる。プロモーター/エンハンサーは同種(すなわち、天然のもの)または異種(すなわち、天然のものではない)であってもよい。細菌におけるエフェクター分子、例えば、サイトカイン、または融合タンパク質の発現を制御するために使用できるプロモーターとしては、限定されるものではないが、 β -ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroffら, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:3727-3731)、または *lac*プロモーター(DeBoerら, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:21-25; *Scientific American*, 1980, 242:74-94)などの原核生物プロモーターが挙げられる。本発明に包含されるその他のプロモーターとしては、限定されるものではないが、*lacI*、*lacZ*、*T3*、*T7*、*gpt*、 λP_R 、 λP_L 、*trc*、*pagC*、*sulA*、*polII* (*dinA*)、*ruv*、*recA*、*uvrA*、*uvrB*、*uvrD*、*umuDC*、*lexA*、*cea*、*caa*、および *recN* が挙げられる(例えば、Schnarrら, 1991, *Biochimie* 73:423-431参照)。好ましい実施形態では、プロモーターは *trc* である(例えば、Amannら, 1988, *Gene* 69:301-15参照)。

[0211]

一次エフェクター分子がSOS応答性プロモーターの制御下で発現されるコリシンである特定の形態では、弱毒化細菌菌株をコリシンの発現が増加するよう α 線、紫外線、アルカリ化剤または別のDNA損傷剤で処理してもよい。例示的SOS応答性プロモーターとしては、限定されるものではないが、*recA*、*sulA*、*umuC*、*dinA*、*ruv*、*uvrA*、*uvrB*、*uvrD*、*lexA*、*cea*、*caa*、*recN*などが挙げられる。

[0212]

もう1つの好ましい実施形態では、プロモーターは腫瘍環境において増大した活性を有する、例えば、*pepT* 遺伝子のP1プロモーターなどの腫瘍の嫌気環境により活性化されるプロモーターである。P1プロモーターの活性化はFNR転写アクチベーターに依存している(Strauchら, 1985, *J. Bacteriol.* 156:743-751)。特定の形態では、P1プロモーターは嫌気条件下で *pepT* 200プロモーターなどの天然のP1プロモーターよりも高レベルで誘導される変異体プロモーターであり、嫌気条件に応じてその活性がFNRではなくCRP-cAMPによって誘導される(Lombardoら, 1997, *J. Bacteriol.* 179:1909-1917)。もう1つの実施形態では、嫌氣的に誘導されるプロモーター、例えば、*potABCD*プロモーターを用いる。*potABCD*は嫌気条件下で *pepT* から分岐して発現されるオペロンである。*pepT* 遺伝子においてこの発現にあずかっているプロモーターは単離されており(Lombardoら, 1997, *J. Bacteriol.* 179:1909-1917)、本発明の方法に従って使用できる。

[0213]

あるいは、プロモーターはTn10トランスポゾンの*tet*プロモーターなどの抗生物質誘導性プロモーターであってもよい。好ましい実施形態では、*tet*プロモーターは例えば三倍に多量化されている。次いで、プロモーター活性は本発明の弱毒化腫瘍標的細菌で治療された患者に適当な用量のテトラサイクリンを投与することによって誘導される。*t*

(56)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

et誘導可能な発現系は最初にスチゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Faryar and Gatz, 1992, *Current Genetics* 21:345-349) および哺乳類細胞 (Lang and Feingold, 1996, *Gene* 168:169-171) などの真核細胞系について記載されたが、最近の研究はその適用を細菌細胞にまで広げている。例えば、Stiegerら (1999, *Gene* 226:243-252) はtetプロモーターに機能しうる形で連結される場合のtet誘導でホタルルシフェラーゼ遺伝子の80倍の誘導を示した。このプロモーターの利点は極めて低いレベルのテトラサイクリン、すなわち抗生物質活性に必要とされる用量の約1/10で誘導されるということである。

【0214】

19

ひとたび、エフェクター分子または融合タンパク質を含んでなるプラスミドを構築し、弱毒性腫瘍標的細菌に導入すれば、エフェクター分子発現または融合タンパク質発現は、限定するものではないが、生物学的活性、酵素活性、ノーザンブロット解析、およびウエスタンブロット解析をはじめとする当技術分野で公知のいずれかの方法によってアッセイできる (Sambrookら, 1989, *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelら, 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, New York, NY参照)。

【0215】

20

5. 7. 組合せ療法

ある実施形態では、固形腫瘍を治療するために弱毒性腫瘍標的細菌をその他の公知の癌療法とともに用いる。あるその他の実施形態では、固形癌腫瘍を治療するために1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌をその他の公知の癌療法とともに用いる。例えば、1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌を化学療法薬とともに使用してもよい。化学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホスファミド、タキソールおよびバクタキソールなどのタキサン、トポイソメラーゼI阻害剤 (例えば、CPT-11、トボタカン、9-AC、およびGG-211)、ゲムシタビン、ビノレルビン、オキサリプレチン、5-フルオロウラシル (5-FU)、ロイコリン、ビノレルビン、テモダール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルチシン、ドキソルビン、ダウノルビン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイ、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイシン相同物、およびサイトキサンが挙げられる。あるいは、1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌を放射線療法 (例えば、 γ 線またはx線照射) とともに使用してもよい。治療される癌の種類によってもいずれの放射線療法プロトコルを用いてもよい。例えば、限定されるものではないが、x線を照射してもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガボルト (1MeVエネルギー以上の照射) を用いてもよく、皮膚癌には電子ビームおよび正電圧x線照射を用いてもよい。放射線に組織を曝露するためにラジウム、コバルトおよびその他の元素の放射性アイソトープなどの γ 線放射性ラジオアイソトープを投与してもよい。

【0216】

40

本発明は抗癌剤と弱毒性腫瘍標的細菌の逐次または同時投与を含む。本発明は、相加的または相乗的である、抗癌剤と弱毒性腫瘍標的細菌の組み合わせを包含する。

【0217】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1以上の抗癌剤と弱毒性腫瘍標的細菌の組み合わせも包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと

50

(57)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

、これらの治療の二重作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤法として用いられるいずれかの薬剤よりも向上した効力をもたらす。

[0218]

本発明はまた抗腫瘍剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌との逐次または同時投与を含む。本発明は、相加的であるか相乗的である、抗腫瘍剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌との組み合わせを包含する。

[0219]

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1以上の抗腫瘍剤と、1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌との組み合わせを包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと、これらの治療の二重作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤法として用いられるいずれかの薬剤よりも向上した効力をもたらす。

[0220]

5. 8 送達のための方法および組成物

本発明は、宿主に対する毒性を低下させた弱毒性腫瘍標的細菌によって、宿主の全身に送達されれば有毒であり得る1以上の一次エフェクター分子を腫瘍に局所的に送達できる方法を提供する。ある実施形態では、一次エフェクター分子は肉腫、リンパ腫、癌腫、またはその他の固形腫瘍を治療するのに有用である。ある限定するものではない実施形態では、エフェクター分子は腫瘍の部位での局所免疫応答の誘導に有用である。

[0221]

本発明によれば、1以上の一次エフェクター分子をコードする核酸分子を含む弱毒性腫瘍標的細菌ベクターおよび所望により1以上の一次エフェクター分子を、固形腫瘍を有するヒト患者をはじめとする動物において腫瘍の増殖を阻害するか、腫瘍の容積を減少させるか、または腫瘍細胞の浸透を防ぐ方法に用いるのが有利である。

[0222]

本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒性腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍の治療のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。本発明はまたかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子および1以上の二次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒性腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍の治療のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。ある実施形態では、一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバー、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチド、抗血管新生因子、腫瘍阻害酵素、またはその機能断片である。

[0223]

本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒性腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍の治療のための本発明の1以上の融合タンパク質の送達法を提供する。本発明はまたかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒性腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍の治療のための本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子の送達法を提供する。

[0224]

(58)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。もう1つの実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は増強された放出系を含んでなる。好ましい実施形態では、動物は哺乳類である。高度に好ましい実施形態では、動物はヒトである。

[0225]

本発明はまたサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌によって送達される、1以上の一次エフェクター分子と所望により1以上の二次エフェクター分子の組み合わせ送達を提供する。本発明はまた1以上の異なる一次エフェクター分子および/または所望により1以上の異なる二次エフェクター分子を保持する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせ送達も提供する。

[0226]

本発明はまたサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌により送達される、本発明の1以上の融合タンパク質の送達を提供する。本発明はまた、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌によって送達される、本発明の1以上の融合タンパク質と所望により本発明の1以上のエフェクター分子の組み合わせ送達を提供する。本発明はまた1以上の異なる融合タンパク質および/または所望により1以上の異なるエフェクター分子を保持する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせ送達を提供する。

[0227]

固形腫瘍としては、限定されるものではないが、肉腫、癌腫および限定されるものではないが生殖細胞系腫瘍、中枢神経系の腫瘍、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、胆膵癌、神経膠腫、膀胱癌、胃癌、肝臓癌、大腸癌、黒色腫、腎臓癌、膀胱癌、および中皮癌をはじめとするその他の固形腫瘍癌が挙げられる。患者は好ましくは、限定されるものではないが、ウシ、ブタ、ニワトリ、イヌ、ネコ、ウマなどのような動物をはじめとする動物であり、好ましくは哺乳類であり、最も好ましくはヒトである。本明細書において、固形腫瘍の治療とは、限定されるものではないが、腫瘍増殖を阻害すること、腫瘍細胞増殖を阻害すること、腫瘍容積を減少させること、または腫瘍細胞の身体その他の部分への蔓延（転移）を阻害することを含む。

[0228]

本発明は医薬上許容される担体および1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は医薬上許容される担体ならびに1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子および1以上の二次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

[0229]

本発明は医薬上許容される担体および1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は医薬上許容される担体ならびに1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

[0230]

本発明はまた医薬上許容される担体および弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物も提供する。本発明はまた医薬上許容される担体ならびに1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物も提供する。かかる組成物は治療上有効な量の、1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌バクテリアならびに医薬上許容される担体を含んでなる。本発明はまた医薬上許容される担体ならびに本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌を含んでなる医薬組成物も提供する。かかる組成物は治療上有効な量の、本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1

(39)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒性腫瘍標的サルモネラ菌バクテラならびに医薬上許容される担体を含んでなる。

【0231】

特定の実施形態では、「医薬（製薬）上許容される」とは、連邦または州政府の監督官庁によって承認された、または米国薬局方もしくは薬物、より詳しくはヒトに使用するためのその他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。「担体」とはそれとともに治療薬が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。かかる医薬担体は水および、ビーナツ油、ダイズ油、無機油、ゴマ油、オリーブ油などのような植物油、動物、植物からのまたは合成起源のものをはじめとする油などの滅菌液体であってよい。医薬組成物が静脈投与される場合には生理食塩水が好ましい担体である。また、生理食塩水溶液および水性キスドロースおよびグリセロール溶液は特に注射用溶液のための液体担体として使用できる。好適な医薬賦形剤としてはデンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は所望により少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐法性製剤などの形態をとり得る。経口製剤は医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準的な担体を含み得る。好適な医薬担体の例はE. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。かかる組成物は治療上有効な量、精製された形態の治療用の弱毒性腫瘍標的細菌を、患者への適当な投与のための形態を提供する好適な量の担体とともに含む。製剤は投与様式に適合するべきである。

【0232】

好ましい実施形態では、組成物は慣例の手順に従ってヒト生命体への静脈投与に合わせた医薬組成物として処方される。典型的には、静脈投与用組成物は滅菌等張水性バファース中の溶液である。必要であれば、組成物はまた沈殿防止剤および注射部位で痛みを和らげるにはリグノカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。一般に、成分は個別にまたは混合して単位用量形態で、例えば、有効薬剤の量を示すアンプルまたはサクションなどの密閉容器中の凍結乾燥剤または水を含まない凍結物として供給される。組成物を点滴によって投与する場合には、滅菌医薬等級水または生理食塩水を含む点滴ボトルで調製してもよい。組成物を注射によって投与する場合には、成分を投与前に混合できるよう注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0233】

固形腫瘍の治療または予防に有効である本発明の医薬組成物の量は癌の性質によって異なり、標準的な臨床技術によって決定できる。さらに、所望により最適な用量範囲を確認するためにin vitroアッセイを使用してもよい。処方使用される正確な用量は投与経路、および癌の重症度によっても異なり、開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。しかしながら、一般には、好適な用量範囲は約1.0 c. f. u. / kg ないし約 1×10^1 c. f. u. / kg; 所望により約1.0 c. f. u. / kg ないし約 1×10^2 c. f. u. / kg; 所望により約 1×10^3 c. f. u. / kg ないし約 1×10^4 c. f. u. / kg; 所望により約 1×10^5 c. f. u. / kg; 所望により約 1×10^6 c. f. u. / kg ないし約 1×10^7 c. f. u. / kg; および所望により約 1×10^8 c. f. u. / kg ないし約 1×10^9 c. f. u. / kg である。有効な用量はin vitroで得られる用量応答曲線または動物モデル試験系から推定できる。

【0234】

種々の送達系が知られており、本発明の医薬組成物を投与するために使用できる。導入方法としては、腹腔内、皮下、筋内、胸腔内、静脈内、皮下、くも膜下腔内、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられる。導入方法はまた腸管内（例えば、

腫瘍領域への直接投与による)であってもよい。

[0235]

組成物はいずれの便宜な経路で、例えば、点滴またはボーラス投与によって、上皮または粘膜皮膚(例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など)を介する吸収によって投与してもよいし、その他の生物学的に活性な薬剤とともに投与してもよい。投与は全身性であっても局所であってもよい。さらに、本発明の医薬組成物を脳室内およびくも膜下腔内注射をはじめとするいずれかの好適な経路によって中枢神経系に導入することが望ましい場合もあり、脳室内注射は例えば、Ommaya リザーバーなどのリザーバーに取り付けた脳室内カテーテルによって容易になり得る。肺投与も例えば、吸入器または噴霧器およびエアロゾル化剤を含む処方剤の使用によって使用できる。

[0236]

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましい場合もあり、これは例えば、限定されるものではないが、手術の際の局所注、カテーテルによる注入、またはシアラストリック(sialastic)膜などの膜もしくは繊維をはじめとする多孔性、非多孔性、もしくはゼラチン状物質であるインプラントによって達成できる。ある実施形態では、悪性腫瘍または新生物もしくは新生物発生前組織の部位(または元の部位)に直接注射によって投与し得る。

[0237]

1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌は徐放システムで送達できる。本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も徐放システムで送達できる。ある実施形態では、ポンプを使用する場合もある(Langer, 上記; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwaldら, 1980, Surgery 88:597;およびSaudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574参照)。もう1つの実施形態では、高分子材料を使用する場合もある(Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (編), CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (編), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983) 参照; Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351;およびHowardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105も参照)。さらに1つの実施形態では、徐放システムを治療標的、すなわち、全身用量の一部のみを必要とする脳の近くに置くこともできる(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 上記, 2巻, 115-138頁(1984)参照)。

[0238]

その他の徐放システムはLanger (1990, Science 249:1527-1533) による総説で論じられており、1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌の投与と関連して使用できる。

[0239]

本発明はまた本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含んでなる医薬キットまたはキットを提供する。かかる容器に関しては、随意的に、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって指示される形の通知がある場合もあり、この通知はヒト投与のための製造、使用または販売に関する機関による承認を反映している。

(51)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0240】

本発明はまた本発明の医薬組成物および少なくとも1種のその他の既知の癌治療をそれが必要とする動物に投与することを含んでなる固形腫瘍の治療法を提供する。特定の実施形態では、固形腫瘍の動物に本発明の医薬組成物および少なくとも1種の化学療法薬を投与する。化学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホスファミド、タキソールおよびバクリタキソールなどのタキサン、トポシメラーゼII阻害剤（例えば、CPT-11、トポテカン、9-ACおよびGG-211）、ゲムシタビン、ビノレリン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコポリン、ビノレリン、テモダール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルチシン、ドキシタビン、ダウノロビン、ジヒドロキシアントラシジン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイ、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイシン相同物、およびサイトキサンが挙げられる。

【0241】

本発明は本発明の医薬組成物と化学療法薬などの抗癌剤の逐次または同時投与を含む。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤の投与前に（例えば、2時間、6時間、12時間、1日、4日、6日、12日、14日、1ヶ月または数ヶ月前）投与する。もう一つの特定の形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤の投与後に（例えば、2時間、6時間、12時間、1日、4日、6日、12日、14日、1ヶ月または数ヶ月後）投与する。特定の形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤と同時に投与する。本発明は、相加的または相乗的である、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌の組み合わせを含む。

【0242】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒性腫瘍標的細菌の組み合わせを含む。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと、これらの治療の二重の作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組み合わせ療法は単一薬剤療法として用いられる薬剤のいずれかよりも向上した効力をもたらす。

【0243】

ある実施形態では、固形腫瘍の動物に本発明の医薬組成物を投与し、かつ、放射線療法（例えば、 γ 線または x 線照射）で治療する。特定の形態では、本発明は放射線療法では効果がないと示されている癌の治療法または予防法を提供する。医薬組成物は放射線療法と同時に投与してもよい。あるいは、放射線療法を本発明の医薬組成物の投与後に、好ましくは医薬組成物の投与の少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1ヶ月、より好ましくは数ヶ月（例えば、3ヶ月まで）後に投与してもよい。

【0244】

本発明の医薬組成物の投与前、同時、またはその後に投与される放射線療法は当技術分野で公知のいずれかの方法で投与できる。治療される癌の種類次第でいずれの放射線療法プロトコルを使用してもよい。例えば、限定されるものではないが、 x 線照射を投与してもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガボルト（1 MeVエネルギーより高い照射）を用いてもよく、皮膚癌には電子ビームおよび正中電圧 x 線照射を用いてもよい。放射線に組織を曝露するためにラジウム、コバルトおよびその他の元素の放射活性アイソトープなどの γ 線放射性ラジオアイソトープを投与してもよい。

【0245】

さらに、本発明はまた放射線療法があまりにも毒性を示すか、または示し得る、すなわち治療を受けている患者にとって受け入れられないか、または耐えがたい副作用をもたらす場合に、放射線療法の代替として癌を医薬組成物で治療する方法を提供する。

【0246】

5. 9 本発明の医薬組成物の治療または予防有用性の証明

本発明の医薬組成物はヒトにおける使用に先立って所望の治療または予防活性について好ましくは *in vitro* で、次いで *in vivo* で試験される。例えば、特定の医薬組成物の投与が指示されるかどうか決定するために使用できる *in vitro* アッセイとしては、患者組織サンプルを培養で増殖させ、医薬組成物に曝露するか、あるいはこれを投与し、かかる組成物の組織サンプルに対する作用を観察する、*in vitro* 細胞培養アッセイが挙げられる。

【0247】

本発明の医薬組成物は免疫細胞を試験医薬組成物または対照と接触させ、試験医薬組成物の免疫細胞の生物学的活性を調節する（例えば、増大させる）能力を調べることによって、活性化された免疫細胞を増強するその能力について試験できる。試験組成物の免疫細胞の生物学的活性を調節する能力はサイトカインまたは抗原の発現を検出すること、免疫細胞の増殖を検出すること、シグナル伝達分子の活性化を検出すること、免疫細胞のエフェクター機能を検出すること、または免疫細胞の分化を検出することで評価できる。これらの活性の測定には当業者に公知の技術を使用できる。例えば、細胞増殖は³H-チミジン取込みアッセイおよびトリパンブルー細胞計数によってアッセイできる。サイトカインおよび抗原発現は、例えば、限定されるものではないが、ウェスタンブロット、免疫組織化学放射免疫アッセイ、ELISA（酵素免疫吸着アッセイ）、「サンドウィッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光免疫アッセイ、タンパク質A免疫アッセイおよびFACS解析などの技術を用いる競合アッセイおよび非競合アッセイ系をはじめとする免疫アッセイによってアッセイできる。シグナル伝達分子の活性化は、例えば、キナーゼアッセイおよび電気移動度シフトアッセイ（EMSA）によってアッセイできる。T細胞のエフェクター機能は、例えば、51Cr放出アッセイによって測定できる（例えば、Palladino, 1987, Cancer Res, 47:5074-5079およびBlachere, 1993, J. Immunotherapy 14:352-356参照）。

【0248】

本発明の医薬組成物は癌を患う動物において腫瘍形成を低下させるその能力について試験できる。本発明の医薬組成物はまた固形腫瘍癌に関与する1以上の症状を軽減するその能力について試験できる。さらに、本発明の医薬組成物は固形腫瘍癌を患う患者の生存期間を延長するその能力について試験できる。当業者に公知の技術を用いて動物における本発明の医薬組成物の機能を分析できる。

【0249】

種々の特定実施形態では、固形腫瘍癌に関与する細胞種のうち代表的な細胞を用いて *in vitro* アッセイを実施し、本発明の医薬組成物がかかる細胞種に対して所望の作用を及ぼすかどうかを調べることができる。

【0250】

治療用の本発明の医薬組成物はヒトにおける試験に先立って、限定されるものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどをはじめとする好適な動物モデル系で試験できる。ヒトへの投与に先立つ *in vivo* 試験のために、当技術分野で公知のいずれの動物モデル系を用いてもよい。

【0251】

以下の一連の実施例は例示のために示されるのであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0252】

6. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるTNF- α の発現

以下の実施例は、TNFファミリーのメンバーをコードする核酸分子を含有する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌などの細菌がTNFファミリーのメンバーを発現できることを証明す

る。

【0253】

6. 1. 1. TNF- α プラスミドの構築

本明細書に記載されるプラスミドは本発明の特定の実施形態の実施例を示すためのものである。当業者には明らかであろうが、trcプロモーターおよび/またはTNF- α をコードする核酸などのプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は当技術分野で公知の方法によってその他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子で置換してもよい。

【0254】

trcプロモーターを用いる、エフェクター分子をコードする核酸のプラスミドに基づく細菌による発現のために、プラスミドTrc99A (Pharmaciaから市販されている) またはTrcHisB (In Vitrogenから市販されている) を用いた。両プラスミドとも開始コドンとしてのNcoI部位とそれに続くマルチプルクロニング部位を用いる。

【0255】

6. 1. 1. pCETプラスミド

二重 λ P_Lまたは λ P_Rプロモーターを用いるエフェクター分子をコードする核酸のプラスミドに基づく細菌による発現のために、以下のようにpCETプラスミドを構築した。プラスミドpCE33 (Elvinら, 1990, Gene 87:123-126) を逐次、制限酵素ClaIで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とし、次いで制限酵素BamHIで切断した。次いで、得られた1.4 kbの断片を2.1 kbのpUC19 (GIBCOから市販されている) のSspI/BamHI断片に結合してプラスミドpCIを作製した。プラスミドpCIを制限酵素BamHIで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とし、次いで制限酵素AflIIIで切断した。得られた3.1 kbのバンドを単離した。プラスミドTrcHisBを制限酵素ClaIで部分消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端とし、次いでAflIIIで切断した。次いで、得られたミニストロンおよびターミネーターを含む0.6 kbのバンドを3.1 kbのpCI断片に結合してプラスミドpCETを得た。pCETは、Trc99AまたはTrcHisBと同様に、開始コドンとしてのNcoI部位とそれに続くTrcHisBマルチプルクロニング部位を用いる。 λ P_Lまたは λ P_Rプロモーターを含むいずれかのプラスミドを保持する細菌を30°Cで増殖させた。

【0256】

6. 1. 2. pTSプラスミド

トランスポゾン媒介性染色体組込みおよびエフェクター分子をコードする核酸のセリン原栄養性選択を行う、pTSと示されるプラスミドを以下のように構築した。プラスミドpNK2883 (American Type Culture Collection (ATCC) から市販されている) を制限酵素BamHIで切断し、4.8 kbのバンドを単離した。配列GAAGATCTTCCGGAGGAGGGGAAATG (配列番号1) からなる正プライマーおよび配列CGGGATCCGAGCTCGAGGGGCCCGGAAGAGTCTAAGAAGATCC (配列番号2) からなる逆プライマーを用いるPCRによってネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 株14028 (ATCCから市販されている) からネズミチフス菌serCをコードする核酸を単離した。PCR反応混合物を制限酵素BglIIおよびBamHIで切断し、1.1 kbのPCR産物を単離して4.8のpNK2883断片に結合してpTSと示されるプラスミドを得た。serCをコードする核酸のすぐ3'側にエフェクター分子をコードする核酸の挿入のためのクロニング部位が存在した。

【0257】

6. 1. 3. pTS-TNF- α プラスミド

trcプロモーターによって制御されるヒトTNF- α をコードする核酸のpTS媒介性染色体組込みのために、プラスミド(pTS-TNF- α)を以下のように構築した。プ

ラスミドPYA3332は、複製開始点がcolE1プラスミド（例えば、Bazara 1およびHelsinki, 1970, Biochem 9:399-406参照）の複製開始点で置換されているASDプラスミドPYA272である（例えば、Curteis, 1984 Nature 312:724-729;およびSalzmanら, 1996, Cancer Biotherapy 11:145-153参照）を制限酵素NcoIで切断し、mung beanスクレアーゼで平滑末端とした。次いで、平滑末端とした断片を制限酵素HindIIIで切断して3.3 kbのDNA断片を単離した。次いで、図1に示される大腸菌最適化ヒトTNF- α をコードする核酸（Pennicaら, 1984 Nature 312:724-729;およびSalzmanら, 1996, Cancer Biotherapy 11:145-153参照）を制限酵素NdeIで切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端とし、次いで、制限酵素HindIIIで切断した。得られた0.5 kbの断片を3.3 kbのPYA3332断片に結合してプラスミドAsd34 TNF- α を得た。次いで、Asd34 TNF- α を制限酵素BglIIで切断し、trcプロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸をコードする1.1 kbの断片をpTSのBamHI部位に結合してプラスミドpTS-TNF- α を得た。

[0258]

6.1.4. pTS-BRPプラスミド

BRPをコードする核酸のトランスポゾン媒介性染色体組込みおよびエフェクター分子をコードする核酸のセリン原栄養性選抜を行う、pTS-BRPと示されるプラスミドを以下のように構築した。配列CCGACGCGTTGACACCTGAAAACCTGGAG (配列番号5) からなる正プライマーおよび配列CCGACGCGTGAAAAGGATCTCAAGAGATC (配列番号6) からなる逆プライマーを用いるPCRによってBRPをコードする核酸をプラスミドpSWI (Bio101, Vista, CAから市販されている) から単離してTOPO-TAクローニングプラスミド (Invitrogen, Carlsbad, CAから市販されている) にクローニングしてpBRP#5と示されるプラスミドを得た。プラスミドpBRP#5を制限酵素ApaIおよびBamHIで切断し、得られたBRPをコードする核酸を含む0.6 kbのバンドを5.9 kbのApaI/BamHI proto-pTS断片に結合してプラスミドpTS-BRPを得た。エフェクター分子をコードする核酸の挿入のためのクローニング部位はBRPをコードする核酸の5' および3' の両側に存在した。

[0259]

6.1.5. pTS-BRPTNF- α プラスミド

BRPおよびtrcプロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸のpTS媒介性染色体組込みのために、プラスミド (pTS-BRPTNF- α) を以下のように構築した。pTS-TNF- α の構築のために上記に記載したプラスミドAsd34 TNF- α を制限酵素BglIIで切断し、trcプロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸をコードする1.1 kbの断片をpTS-BRPのBamHI部位に結合してプラスミドpTS-BRPTNF- α を得た。

[0260]

6.2. エフェクター分子をコードする核酸のサルモネラ菌宿主染色体への組込み 本明細書に記載される系は、セリンまたはグリシン栄養要求性の $\Delta serC$ -サルモネラ菌株および活発に転写される領域への染色体組込みの際にセリン/グリシン原栄養性を回復するプラスミドを用いる。しかしながら、染色体組込み体を選択するためにその他の選択マーカーを使用してもよいことは当技術分野では十分に知られており、かかるマーカーは本発明の範囲内にある。例えば、Klecknerら, 1991, Meth. Enzymol. 204:139-180参照。

[0261]

エフェクター分子をコードする核酸を含むpTSまたはpTS-BRPプラスミドを化学的形質転換およびエレクトロポレーションをはじめとする当技術分野で十分に公知のいくつかの手段によって $\Delta serC$ -サルモネラ菌株に導入してもよい。エフェクター分子をコ

ードする核酸の導入後、サルモネラ菌をアンピシリン含有増殖培地で最小限2時間、より好ましくは6時間以上増殖させる。次いで、セリン原栄養性の細菌を選択できる培地、例えば、M56培地、Atlas, R. M. 「Handbook of Microbiological Media」 L. C. Parks, 編, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993に細菌をおく。エフェクター分子をコードする核酸の染色体組込みを有する細菌は選択培地で増殖できる。次いで、エフェクター分子をコードする核酸の発現を以下に示されるように測定する。エフェクター分子をコードする核酸の発現は酵素活性、生物学的活性、ノーザンブロット解析、またはウェスタンブロット解析などの当業者に公知のいくつかの方法のいずれで測定してもよい。

[0262]

6. 2. 1. サルモネラ菌によって発現されたTNF- α の送達および発現
上記のように、trcプロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸をpTS-BRPのBamHI部位に挿入してpTS-BRPTNF- α と示されるプラスミドを得た。当技術分野で公知の標準的な方法によって、プラスミドpTS-BRPTNF- α を、遺伝形質が Δ msbB、 Δ purI、 Δ serC(図2)となるようにserC-として構築したネズミチフス菌の弱毒化菌株、菌株VNP2009(国際特許WO99/13053参照)にエレクトロポレーションした。メカニズムについて限定するものではないが、プラスミドの細菌ゲノムへの組込みによりserCをコードする核酸の活性化が可能となり、serC⁺表現型をもたらす。従って、エレクトロポレーションした細菌をアデニンを添加したM56寒天プレートにプレーティングすることでTNF- α をコードする核酸の染色体組込みを有する細菌を選択した。細菌を、プラスミドの喪失および同時にプラスミドに基づくTNF- α 発現の喪失を示す、アンピシリン耐性の喪失についてさらに特性決定した。

[0263]

本発明の懸念を標的とする細菌によるTNF- α の発現を調べて定量するために、TNF- α をコードする核酸の染色体組込みを有するサルモネラ菌を一晩増殖させ、培養物の測定したサンプルをウェスタンブロット解析に用いた。特に、pTS-BRPTNF- α クローン2と示される代表的なserC⁺アンピシリン感受性クローンからのTNF- α の発現が図3に示されている。ウェスタンブロット解析により、 3.9×10^7 cfuのpTS-BRPTNF- α クローン2細菌に相当する(レーン1)細菌タンパク質が50 ngより多いTNF- α を発現するということが示され(レーン5)、このことは10 ng/10⁷細菌より多いレベルでのTNF- α の発現を示唆する。従って、ヒトTNF- α は、サルモネラ菌において、染色体に組み込まれた、trcプロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸から上手く発現された。

[0264]

7. OMPA融合タンパク質を発現する弱毒化腫瘍標的細菌

種々のシグナルペプチドへの融合によるタンパク質の周辺細胞質局在化はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存している。例えば、タンパク質はタンパク質のアミノ末端へのシグナルペプチドの融合によって細菌の細胞周辺コンパートメントに局在化される。限定することはないが、周辺細胞質局在化は、細菌の成分(タンパク質など)が周囲の環境に放出されるために単一の膜のみを通過すればよいので、細菌の成分の放出を促進すると考えられている。対照的に、細胞質内局在化は、成分が周囲の環境に放出されるためには細菌の内膜と外膜の双方を通過することを要求する。さらに、特定のタンパク質の周辺細胞質局在化は生物学的活性を補助する場合もある。

[0265]

本発明のエフェクター分子を周辺細胞質に向けるためには当技術分野で公知の種々の方法を使用できる。本実施例はTNF- α 、TRAIL(TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド)、およびインターロイキン-2(IL-2)などのエフェクター分子のアミノ末端へのompAシグナルペプチドの融合が周辺細胞質局在化とその後のタンパク質のプロセッシングをもたらすということを証明している。

【0266】

7. 1. OMPA-TNF- α 融合タンパク質のプロセッシング

4種の異なるクローンにおけるTNF- α 発現、すなわちJM109細菌においてプラスミドに基づくtrcプロモーターによって動かされるompA-TNF- α 融合タンパク質の発現を全細胞溶解物のウェスタンブロット解析によって調べた。周辺細胞質に局在する酵素であるシグナルペプチダーゼによる前駆体融合タンパク質の成熟TNF- α への切断によって周辺細胞質局在が証明された。4種のクローンすべてにおいて、IPTGでの誘導後のTNF- α の過剰発現により、TNF- α が、プロセッシングされていない型とプロセッシングされた型の双方に対応する約20 kDで移動する二重線として現れた(図5、レーン4~7)。比較のために、染色体に組み込まれたTNF- α をコードする核陰¹⁰を有する成熟(プロセッシングされた)型のTNF- α を発現するサルモネラ菌株を正の対照として用いた(図5、レーン3)。TNF- α をコードする核陰を欠いている細菌ではTNF- α 発現は検出されなかった(図5、レーン2)。

【0267】

これらの結果は、成熟ヒトTNF- α タンパク質の大腸菌ompAシグナルペプチドへの融合(図4に示されるような)は大腸菌で発現される場合には周辺細胞質局在およびプロセッシングをもたらすということを証明する。さらに、分泌されるタンパク質の過剰発現が細菌宿主にとって毒性であるかどうかは、正常な分泌組織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたompA-TNF- α 融合タンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レベル発現に適応できるということ²⁰を示唆した。

【0268】

7. 2. OMPA-TRAIL融合タンパク質のプロセッシング

ompAシグナルペプチドのTNFファミリーのメンバーを周辺細胞質に局在させる能力を、TNFファミリーのもう1つのメンバーであるTRAIL (TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド)にまで拡張した。これらの実験のために、ヒトTRAIL (hTRAIL)の成熟型をコードする、trcプロモーターによって動かされるTRAILをコードする核陰をompAシグナルペプチドのコード配列に融合した(図6に示されるように)。一方はNcoI部位をコードし、もう一方はNdeI部位をコードする2種の異なるompA/TRAIL接合点を調べた(NdeIを含む配列については図6参照)。³⁰両種のクローンのウェスタン解析が図7に示されている。抗hTRAIL抗体を用いるウェスタンブロット解析によってNcoI接合したompA-TRAILを過剰発現する細菌はhTRAILのプロセッシングされた型(28.2 kD)とプロセッシングされていない型(30.2 kD)の双方を発現し(図7、レーン2~4)、他方、NdeI接合したompA-TRAILを過剰発現する細菌はもっぱらプロセッシングされた型を発現する(図7、レーン4~7)ということが示され、このことはNdeI接合がより効率的なプロセッシングをもたらしたということを示唆する。

【0269】

これらの結果は、成熟ヒトTRAILタンパク質の大腸菌ompAシグナルペプチドへの融合は周辺細胞質局在およびプロセッシングをもたらすということを証明した。⁴⁰さらに、分泌されるタンパク質の過剰発現が細菌宿主にとって毒性であるかどうかは正常な分泌組織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたompA-TRAIL融合タンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レベル発現に適応できるということを示唆した。

【0270】

7. 3. OMPA (SL) - IL-2融合タンパク質のプロセッシング

二次エフェクター分子(IL-2)を融合タンパク質として発現させた。成熟(C125A)hIL-2の、TNF- α およびTRAILについて上記で用いたような、野生型OmpAシグナル配列への融合ではIL-2のプロセッシングが可能にならなかった。ヒトIL-2サイトカインの周辺細胞質局在およびプロセッシングを調べるために、成熟ヒト⁵⁰

(57)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

C125A) IL-2を国8に示されるように、ompA(8L)と示される改変ompAシグナルペプチドに融合させた。改変ompAシグナルペプチドはompAシグナルのアミノ酸6~17を国8に示されるもので置換することによって改変した。発現およびプロセッシングが図9に示されている(レーン6および7)。各レーンは単一のクローンを表す。ウェスタンブロット解析の結果はompA(8L)シグナルペプチドを用いることで、事実上完全なプロセッシングが認められることを示した(図9、レーン6および7)。

[0271]

7. 4. PHOA(8L)-IL-2融合タンパク質のプロセッシング

ヒトIL-2の周辺細胞質局在およびプロセッシングについて第2の融合タンパク質を調べ、7. 3. 節の融合タンパク質と比較した。図10中で、phoA(8L)と示される改変phoAシグナルペプチドに融合した成熟ヒト(C125A)IL-2の発現およびプロセッシングを調べた。発現およびプロセッシングが図9に示されている。ompA(8L)シグナルペプチドを用いてより完全なプロセッシングが認められたのに対し(図9、レーン6および7)、合成phoA(8L)シグナルペプチドでは部分的なプロセッシングしか認められなかった(図9、レーン4および5)。

[0272]

これらの結果はIL-2の局在およびプロセッシングが異なるシグナルペプチドによって提供されたということを示す。この結果はまた、種々のシグナルペプチドへの融合によるタンパク質の周辺細胞質局在はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存しているというところを証明する。

[0273]

融合タンパク質研究の結果は、I1-2などの本発明の二次エフェクタータンパク質はOmpAまたはPhoAなどのタンパク質シグナルペプチドとの融合によって発現され、細菌の周辺細胞質に局在されるということを示す。当業者には明らかであろうが、その他のシグナル配列を用いて利用され得るエフェクター分子の周辺細胞質局在を引き起こすこともできる。当業者にはさらに明らかであろうが、本発明のその他のエフェクター分子を本明細書の実施例に記載されるエフェクター分子と置換することもできる。

[0274]

8. 実施例：成熟型のTNF- α を発現するサルモネラ(Δ MSEB、 Δ PUR1)の抗腫瘍効果

以下の実験は、一次エフェクター分子(例えば、TNFファミリーのメンバー)をコードする核酸を含むサルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌は哺乳類腫瘍に一次エフェクターを運送することができ、腫瘍体積を減少させることを証明する。

[0275]

TNF- α のネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)の抗腫瘍効果を高める能力は段階的なネズミ大腸38癌モデルで評価した。これらの実験では、大腸38癌由来の1mm³の腫瘍断片をC57BL/6マウス腫瘍へ移植し、腫瘍を平均サイズ約0.3gまで増殖させ、この時、動物を以下の処理群(n=10)に無作為に配置した：1)無処理；2)ネズミチフス菌(Δ msbB、 Δ pur1、serC)(Δ msbB、 Δ pur1、serC)；および3)PTS-ERPTNF- α (上記の大腸2)。各群のマウスは処理しないうち、あるいは適当な細菌株1 \times 10⁶cfuの静脈注射を1回施した。細菌接種時から始め、毎週腫瘍サイズを測定した。

[0276]

TNF- α を発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラを施した群では、処理後2週間で腫瘍の退縮が明白であり、処理後4週間で動物のうち6個体で完全な退縮が見られた(図11)。無処理群では腫瘍は徐々に大きくなったが、ネズミチフス菌親株(Δ msbB、 Δ pur1、serC)で処理した群の腫瘍は処理後3ないし4週の間に部分的な退縮を示したが、その後徐々に大きくなった(図11)。

[0277]

59

(58)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

これらの結果は、弱毒化腫瘍標的サルモネラがTNFファミリーのメンバーなどのエフェクター分子を発現して腫瘍へ送達できることを証明するものである。このようなサルモネラは腫瘍の治療に有用であり、TNFファミリーのメンバーを発現しないサルモネラ菌株と比較して腫瘍退縮の結果を増強する。

【0278】

染色体に組み込まれた核酸からTNF- α を発現するサルモネラにより完全な腫瘍退縮が示されることは、染色体に組み込まれたエフェクター分子をコードするから生物学的に有効な発現が生じることを示す。

【0279】

9. 実施例：BRPを発現する細菌による核酸分子の送達の増強

BRP活性がサルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌からのプラスミドの放出を増強することを示すため、プラスミドならびに放出マーカー（AMPマーカーを有するpTrc99a）として用いられる第2のプラスミドにBRPを含んだ弱毒化腫瘍標的サルモネラ株を構築した。BRPの活性を評価するため、BRPを含む、あるいは含まないサルモネラを標準法による培養で増殖させた。次に得られた上清から遠心分離および濾過によって残存する細菌を除去した後、明澄な上清をコンピテント細胞に加え、形質転換反応を行った。次にこれらのレシビエント細胞をLB amp培地で平板培養し、AMPマーカープラスミドの取り込みを調べた。BRPを有するAMP耐性コロニー数が増加していれば、より多くのプラスミドがBRP発現株から培地へ放出されたことを示す。

【0280】

結果は以下の表2に要約されている。

【0281】

【表2】

プラスミド	AMPの平均数 コロニー/形質転換
pTrc99a 単独	125
pTrc99a+BRP (pSW1)	388

【0282】

これらの結果はBRPが存在すると培地へ分泌されるampプラスミドの量が増えたことを示している。このように、BRP発現細胞由来上清の「レシビエント細胞」への形質転換ではコロニー数が増える。これらの結果は、BRPが核酸プラスミドを含む二次エフェクター分子の放出を増強したことを示す。従って、これらの結果は、BRPがプラスミドの放出またはDNA送達に有用であることを示す。さらに、BRPを発現し、DNAを送達することができるこれらのサルモネラ株は集団として複製能を留めていた。

【0283】

10. 実施例：BRP発現は弱毒化腫瘍標的サルモネラの腫瘍標的化能または腫瘍阻害能を損なわない

以下の実施例は、弱毒化腫瘍標的細菌が1以上のエフェクター分子と共にBRPを発現するよう操作して細菌の腫瘍標的能を阻害することなくエフェクター分子の腫瘍への送達を増強することができることを示す。

【0284】

固形腫瘍モデルはB16メラノーマ細胞をC57BL/6マウスの右後脚の脛に皮下注射することで得た。腫瘍の移植のために、トリプシン処理によりプラスコから細胞を解離させ、洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水に 2.5×10^6 細胞/mlで懸濁させた。細胞懸濁液0.2mlアリコート（総数 5×10^6 細胞/マウス）を第0日目に注射した。腫瘍の体積が150ないし200mm³に達した際（移植後約10日）、マウスを無作為に10個体の群に分け、各群に異なる処理を施した。対照群（図12の曲線#1）には0.2mlのPBSを施した。別の群にはサルモネラVNP20009の弱毒化腫瘍標的株 2×10^6 c. f. u. /マウスを含有する0.2mlを施した（図12の曲線#2）。第3の

群には、その天然プロモーターの制御下にBRP遺伝子を含むプラスミドであるpSW1を含む弱毒化腫瘍標的サルモネラ株 2×10^8 c. f. u./マウスを含有する0.2 mlを施した(図12の曲線#3)。BRP遺伝子は大腸菌内ではSOS誘導性である。しかしながら本発明者らは、メカニズムは特定できないが、BRP遺伝子はサルモネラ菌内では部分的に構成的であり、低レベルから中レベルのBRPタンパク質を産生するが、腫瘍環境におけるSOSの性質によってその産生はさらに増強すると信じている。BRP発現VNP20009サルモネラを注射したマウスは非BRP発現VNP20009を注射したものとはほぼ同様の腫瘍病変を示したが、このことはこれらのサルモネラ菌の生存または腫瘍標的化能がBRPの発現によって変化しないし、腫瘍増殖阻害能も変化しないことを示している。弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌におけるBRP発現の結果は分泌型HSV

チミジンキナーゼ(HSV-TK)の発現の効果と対照的である。HSV-TKの発現はVNP20009の腫瘍阻害能の欠損をもたらす(Pawelekら, 1997, Cancer Res. 57:4537-4544)。このようにBRP系はさらなる改変を伴わずに一次および/または二次エフェクター分子の腫瘍への送達を増強するのに使用できる。

[0285]

11. 実施例: pepTプロモーター発現運搬体

この実施例はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌におけるpepTプロモーターの制

御下、 β -galなどのレポーターをコードする核酸分子のin vitroおよびin vivo発現を示す。

[0286]

11.1 実施例: pepT-BRP- β GAL発現プラスミドの構築

pepTプロモーターは、以下のプライマー:

フォワード: 5'-AGT CTA GAC AAT CAG GCG AAG AAC GG-

3' (配列番号15)

リバース: 5'-AGC CAT GGA GTC ACC CTC ACT TTT C-3'

(配列番号16)

を用いて、単離した野生型ネズミチフス菌(ATCC14028)のコロニー由来の領域

のPCR増幅によりクローニングした。

[0287]

PCR条件は、95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、65℃にて1分間、

72℃にて2分間を35サイクル、および72℃にて10分間を1サイクルであった。こ

のPCR産物をPCR2.1クローニングベクター(Invitrogen, Carlsbad, California)へクローニングし、PepT/PCR2.1と名付

けた。

[0288]

このPepT/PCR2.1ベクターをNcoIおよびXbaIで切断した。PepT断片

をゲルで単離し、同じ酵素で切断した β -gal Ztermベクターへ連結した。Z

term(Temporary Genbank Bankit No. 296495)は、 β GALオープンリーディングフレームをpUC19へクローニングすることによ

って作製されたプロモーターのない β -galプラスミドである。得られたプラスミドをpe

pT- β GALと名付けた。

[0289]

11.2 pepT- β GALのin vitro発現とpepT- β GAL活性の測定

pepT- β GALを担持するサルモネラ株YS1456(図13AのCC14;この菌

株の遺伝構成についてはWO96/40238参照)またはVNP20009(図13A

のCC16)を嫌気または好気条件のいずれかの下でOD₆₀₀が~0.5ないし0.8

まで増殖させた。 β -gal活性はBirgeおよびLow(1974, J. Mol. Biol. 83:447-457)の方法で測定した。結果は図13Aに示しているが

、嫌気条件下での細菌の増殖時の β -gal活性が約1.4ないし2.4倍誘導されたことを

示す。

【0290】

11.3 pepT- β GALのin vivo発現とpepT- β GAL活性の測定
 pepT- β gal発現プラスミド、BRP発現プラスミド(B10101由来のpSW1 (Vista, California)、これはその天然プロモーターの制御下にpC10DF13 BRPコード配列を含む)、または双方の発現プラスミドを担持するサルモネラ株YS1456の細胞を腫瘍維持マウスに静脈注射した。注射後5日目に腫瘍および肝臓をホモジナイズし、細菌を単離してpepT- β galおよび/またはBRPのプラスミドの存在がこれらの細菌の腫瘍標的化能を阻害しなかったことを示した。さらに、腫瘍および肝臓ホモジネートを用いて β -gal活性を測定し、活性型 β -galが*in vivo*で測定可能かどうか、またpepTプロモーターが嫌気性腫瘍環境において誘導されるかどうかを調べた。結果は図13Bに示されており、腫瘍環境における極めて高レベルのpepTプロモーター活性を示す。バックグラウンドレベルに対して肝臓の β -gal発現における有意な増強は見られず、これは好気性の肝臓環境におけるpepTプロモーターの低活性および/または細菌ベクターの肝臓への標的化能が低いことに帰因するものと思われる。

【0291】

12. 実施例：テトラサイクリン誘導発現系

この実施例はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌のtetプロモーターの制御下にある β -galなどのリポーター遺伝子をコードする核酸分子の発現を示す。

【0292】

tetプロモーターは以下のプライマー：

フォワード：5'-GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG-3' (配列番号17)

リバース：5'-GGT TCC ATG GTT CAC TTT TCT CTA TCA C-3' (配列番号18)

を用いてPCR増幅によりミニ-TN10トランスポゾンからクローニングした。

【0293】

PCR条件は以下の通りであった：95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて2分間を35サイクル、および72℃にて10分間を1サイクル。

【0294】

~400bpのPCR断片をゲルで単離し、PCR2.1ベクター(Invitrogen)にクローニングした。PCR2.1/tetプロモーターベクターをNcoIおよびBamHIで切断した。この~400bpのtetプロモーター断片をゲル単離し、同じ2酵素で切断したプロモーターのない β -galベクター-Ztermに連結した。連結混合物を形質転換し、形質転換した細菌をテトラサイクリン/X-galプレート上で平板培養した。陽性コロニーを青色を基に単離した。いくつかの陽性コロニーからの抽出物を作製し、BirgeおよびLow (1974, J. Mol. Biol. 83:447-457)の方法によりテトラサイクリンの存在下での β -gal活性に関してアッセイした。1つのクローンを単離し、一定の範囲のテトラサイクリン濃度におおって β -gal発現に関してアッセイした。アッセイの結果はテトラサイクリンによって用量依存的に β -gal活性が誘導されることを示し、図14に示されている。

【0295】

13. 実施例：エンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌による腫瘍増殖の阻害

以下の実施例はエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の作製、および*in vivo*におけるかかるサルモネラ菌による腫瘍治療の効果を示す。

【0296】

13.1 エンドスタチン発現プラスミドの構築

(71)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

エンドスタチンは、以下のプライマー：

フォワード：5' -GTG TCC ATG GGG CAC AGC CAC CGC GAC
TTC CAG-3' (配列番号19)

リバース：5' -ACA CGA GCT CCT ACT TGG AGG CAG TCA
TGA AGC T-3' (配列番号20)

を用いてヒト胎盤cDNAライブラリーからPCR増幅した。

【0297】

得られたPCR産物をPCR2.1ベクター (Invitrogen) ヘクローニングした。ヘキサヒスチジン-エンドスタチンは以下のプライマー：

フォワード：5' -GTG TCC ATG GCT CGG GCA AGT GTC
GGG ACT GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC C
AC CGC GAC TTC-3' (配列番号21)

リバース：5' -GTG CGG ATC CCT ACT TGG AGG CAG TCA
TGA AGC TG-3' (配列番号22)

とともに、鋳型として上記で構築したプラスミドを用いてPCR増幅した。

【0298】

PCR増幅条件は、95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間を30サイクル、および72℃にて10分間を1サイクルであった。

【0299】

得られた産物はそのアミノ末端にペプチド配列MARRASVGT DHHHHHH (配列番号23) を有するヒトエンドスタチンをコードするNco I (5') およびBamHI (3') 制限部位を持つDNA断片であった。

【0300】

このPCR産物をNco IおよびBamHIで切断し、550bpの産物をゲルで単離し、同じ酵素で予め切断したpTrc99Aベクターへ連結した。この連結反応産物を大腸菌DH5αおよび弱毒性腫瘍標的サルモネラ株VNP20009へ形質転換した。

【0301】

ヘキサヒスチジン-エンドスタチンコード配列もまた、Nco I/BamHI断片として発現ベクターYA3334にクローニングした。YA3334はColEIの複製起点に置き換えられた複製起点を有する (BazaralおよびHelsinki, 1970, Biochem 9:399-406) asdプラスミドPYA272 (Curtiss III, 米国特許第5,840,483号) である。陽性クローンから調製したプラスミドDNAを単離し、サルモネラ株8324へ形質転換し、これがasd変異を有するVNP20009である。この菌株はCurtiss III (米国特許第5,840,483号) に記載の方法に従って作製した。

【0302】

1.3.2 弱毒性腫瘍標的サルモネラ菌によるエンドスタチンのin vitro発現
pTrc99A-ヘキサヒスチジン-エンドスタチンプラスミドを含む種々のサルモネラ菌VNP20009株および大腸菌DH5α株を対数増殖中期 (O.D.₆₀₀ が0.6ないし0.8) まで増殖させ、この時点で各培養物を分割し、一方にはtrcプロモーター活性の誘導のために0.1mM IPTGを施し、もう一方にはIPTGは施さなかった。さらに3時間増殖させた後、細菌抽出物を調製し、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンの発現を抗ヒスチジン抗体 (Clontech, Palo Alto, California) を用いてウェスタンブロット解析により確認した。図15Aおよび15Bはそれぞれ大腸菌DH5αおよびサルモネラ菌VNP20009におけるpTrc99A-ヘキサヒスチジン-エンドスタチン (HexHIS-エンドスタチン) の発現を示すウェスタンブロットの結果を示している。trcプロモーターはIPTGの不在下の大腸菌では活性は見られなかったが、同じプロモーターがサルモネラ菌では構造的に活性であった。ヘキサヒスチジン-エンドスタチンは約25kDの単一のバンドで現れ、これがこの融

合タンパク質の推定分子量である。

【0303】

ヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンパク質は同様に、発現の支配に *t r e p* プロモーターを利用する γ A 3334 プラスミドからも発現した。図16に示されているように抗ヒスチジン抗体を用いて推定分子量 25 kDa のタンパク質を検出した。図16では、サンプルが由来する全ての細菌培養物を 0.1 mM IPTG で3時間誘導した。

【0304】

1.3.3 C38ネズミ大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒性腫瘍標的サルモネラ菌の効果

2×2×2 mm³ の体積の大腸C38腫瘍断片を9週齢の雌C57BL/6マウスに皮下移植した。腫瘍体積が1000 mm³ に達した際、それらを摘出し、2×2×2 mm³ の断片に切断した。これらの断片をもう1回一週間のサイクルを終らせ、得られた2×2×2 mm³ の断片を雌C57BL/6マウスの右腿に皮下移植した。腫瘍体積が1500ないし2000 mm³ に達した際（移植後約24日後）、マウスを10個体6群に無作為に分け、各群に異なる処理を施した。1つの対照群には0.2 ml のPBSを施した。もう1つの対照群には対照 *a s d* プラスミド（すなわち、上記第5.6に記載のように *a s d* プラスミドは挿入されていない）を有する弱毒性腫瘍標的サルモネラ菌株 VNP 20009 を1×10⁶ c. f. u. 含む0.2 ml を施した。第1の実験群には *a s d* プラスミドにおいてヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンパク質を発現する VNP 20009 を1×10⁶ c. f. u. 含む0.2 ml を施した。第2の実験群には第1の群と同じ発現構築物およびさらに発現されるBRPを有する VNP 20009 を施した。

【0305】

図17はこれらの実験の結果を示したものであり、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンを発現する VNP 20009 株のによる腫瘍抑制の効果を示す。処理後60日では、エンドスタチンを発現する VNP 20009 サルモネラ菌の腫瘍サイズ中間値は、対照動物の腫瘍サイズ中間値の約13%であり、空のベクターを担持する VNP 20009 サルモネラ菌で処理した動物の腫瘍サイズ中間値より30%以上低かった。生き残った動物のうちの多くが、正味の腫瘍サイズの小さな変化によって示されるように腫瘍増殖にほとんど変化が無いことを示し、あるいは強い腫瘍抑制を示した。処理の遅延または効果が不十分なこと、エンドスタチン送達率が不十分であることに反映されている可能性が最も高い。このことは、エンドスタチンが封入体に集積することを見出している O' Reilly ら（1997, *C e l l* 88:277-285）と合致する。エンドスタチン送達率はBRPの発現によって増強される。BRPの発現はその天然プロモーターによって制御されるが、通常は細菌で SOS 応答を示す。BRP発現は対照集団の平均腫瘍体積の約6%まで平均腫瘍体積を小さくすることが示された。さらに、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンおよびBRPで処理したマウス集団では、数個体のマウスが経時的に腫瘍体積に著しい減少を示し、腫瘍体積は最初の腫瘍体積の約10以下まで縮小した。BRPの効果は二重であると考えられ、1つはBRP自体が抗腫瘍活性を有すること、もう1つはBRPが周辺細胞質内容物の放出、およびエンドスタチンをはじめ細胞質内容物の放出をある程度は促進し、これが封入体でタンパク質が集積するのを防ぐということである。

【0306】

1.3.4 DLD1ヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒性腫瘍標的サルモネラ菌の効果

対数増殖期まで増殖させたDLD1細胞培養物にトリプシン処理を施し、PBSで洗浄し、PBS中5×10⁶ 細胞/mlの懸濁液を再構成した。各々5×10⁶ 細胞を含む単一の細胞懸濁液のアリコート0.1 ml を9週齢の雌ヌードマウス（Charles RiverからのNu/Nu-CD1）の右腿に皮下注射した。マウスを各10個体3群に無作為に分けた後、注射後10ないし15日、または腫瘍体積が200ないし400 mm³ に達するまで同期化した。

【0307】

(73)

JP 2004-500042 A 2004.1.18

第1群のマウスは対照群であり、各々に0.3mlのPBS注射を施した。第2群のマウスには対照asdプラスミドを担持する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌VNP2を 0.009×10^8 c. f. u. 含む0.3mlを施した。第3群のマウスにはヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンパク質およびBRPを発現するasdプラスミドを担持する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌VNP20009を 1×10^8 c. f. u. 含む0.3mlを施した。腫瘍をモニターし、1週間に2回測定した。図13は3処理の投与後の腫瘍体積をグラフで表したものであり、DLD1ヒト大腸癌の増殖に対する、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の抑制作用が示されている。

【0308】

空のベクターPYA3332を担持するVNP20009は腫瘍増殖を有意に阻害することとはできなかった。しかし、エンドスタチンおよびBRPを発現するVNP20009は腫瘍増殖を阻害することができた。これらの結果は、エンドスタチンとBRPの組合せがPYA3332ベクターを担持するVNP20009(8324株)のいずれかの抗腫瘍作用を増強することを示している。

【0309】

1.4. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌による抗血管新生因子の発現

以下の実施例は、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌を、抗血管新生因子トロンボポンジンAHR、血小板第4因子およびアポミグレンを発現するよう操作するために用いられる方法論を示す。

【0310】

1.4.1 トロンボポンジンAHRをコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

トロンボポンジンの抗血管新生相領域(AHR)に相当するペプチド配列TIP13.40: AYRWRLSHRPKTGFIRVVMYEG(配列番号24)(例えば、特許出願第C07K-14/78参照)を逆転写し、サルモネラ菌での発現のためにコドンの至適化を行い、DNA配列:

GCG TAC CGC TGG CGC CTG TCC CAT CGC CCG AAA A
CC GGC TTT ATC CGC GTG GTG ATG TAC GAA GGC (配列
番号25)を得た。このペプチドを合成するため相補的オリゴヌクレオチド(オリゴ13:40-1およびオリゴ13:40-2)を作製した。5'末端において、OMPAのプロセッシング領域をコードする配列およびSpeI制限部位を付加した。3'末端において、BamHI制限部位とともに停止コドンを付加した。この2つのオリゴをアニーリングして二本鎖DNA断片を作製した。このDNA断片をSpeI/BamHIで切断し、SpeI/BamHI切断ベクターpTrec801iL2に連結して、全長改変OmpAリーダー配列を含むプラスミドpTrec801-13.40を作製した。プロセッシングされると、この配列は完全長の13.40トロンボポンジンペプチドとなる。

【0311】

オリゴ 13.40-1

5'gttactagtgtgcccgaaggcgggtaccgctggtgcccgtgtcccatgccccgaaaccc
ggctttatccgctggtgatgtacgaaggctaaagatccgcgc3' (配列番号26)

オリゴ 13.40-2

5'ggcgagatcctttagccttcgtacatcaccacggcgataaagccgggttttcggggc
gatgggacagggccacgacgggtacgcccctggcgccactgacac3' (配列番号27)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す)

【0312】

1.4.2 血小板第4因子ペプチド(47-70)をコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

血小板第4因子(PF-4; 例えばMajoneら, 1990, Science 24

(74)

JP 2004-500642 A 2004.1.8

7:77-79およびJoanら, 1999, Blood 94:984-993参照)のC末端のアミノ酸残基47-70からなるペプチドを、サルモネラ菌での発現のためにコドンの至適化を行った。以下に示されるこのペプチドは、CFU-GM造血細胞上でPF-4の活性阻害に関与するDLQモチーフおよび主なヘパリン結合ドメインである塩基性アミノ酸クラスターを含む。

[0313]

血小板第4因子:

MSSAAGFCASRPGLLFLGLILLPLVYAFASAEEDGDLQCLCVKTTTSQV
RFRHITSLEVAKAGPHCPTAQLIATLKNGRKICLDLOAPLYKKIKKILLES
 (配列番号 28)

10

シグナルペプチド=下線・太字

Lys 61、62、65、66=主なヘパリン結合ドメイン(太字)

DLQ(7-9、54-56)=CFU-GM造血細胞に対する阻害活性(太字)

[0314]

このペプチドを合成するため、相補的オリゴヌクレオチド(オリゴPF4-1およびオリゴPF4-2)を作製した。5'末端においてOmpAおよびSpeI制限部位のプロセッシング領域コードする配列を付加した。3'末端において、BamHI制限部位とともに停止コドン(下線)を付加した。この2つのオリゴをアヌーリングして二本鎖DNA断片を作製した。制限切断した後、この断片をSpeI/BamHIで制限処理したベクター-pTrc801に連結してプラスミドpTrc801-PF4を作製した。プロセッシングされると、この配列は完全長のPF-4(47-70)ペプチドとなる。

20

[0315]

オリゴPF4-1

5'ctcactagtgctccgagcgAAGCGCGCAAAATCTGCTGGACCTGCAGGCGCGCTG
 GTACAAAAAATCATCAAAAACTGCTGTAAGCTAA ggaacc ggc3'
 (配列番号 29)

30

オリゴPF4-2

5'cgcggaaccTTAGCTTTCCAGCAGTTTTTTTGATGATTTTTTTGTACAGCGGCGCCTG
 CAGGTCACGCAGATTTTTCGGCCGCTTgacgagcgcacacgaag3' (配列番号 30)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す)

[0316]

14.3 アポミグレンをコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

抗血管新生ペプチドアポミグレン

(IYFDFGRDIMTDPSPWFQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEAW
 RTADTAVTGLASPLSTGKILDDQKAYSCANRLIVLCIENSF
 MTDARK (配列番号 31); 例えば、国際公報WO99/29856参照)はコラーゲンXVのタンパク質分解断片であるレスチンのC末端に相当する。オリゴヌクレオチド(オリゴApom5FおよびオリゴApom6F)を、ヒトcDNA由来のDNA断片を増幅するように設計した。5'末端において、OmpAのプロセッシング領域をコードする配列およびSpeI制限部位を付加した。3'末端において、BamHI制限部位とともに停止コドン(下線)を付加した。

40

[0317]

(75)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

オリゴ Apom5F: 5'-gagcttc actagc gtagccagacg ATATACTCCTTGATGGTCG-3'.

(配列番号 32)

オリゴ Apom6R: 5'-cgc ggatcc TTACTTCCTAGCGTCTGTCATGAAACTG-3'

(配列番号 33)

(制限部位はイタリックで示し、Omp A プロセッシング認識部位は下線で示す)

[0318]

正確なサイズの断片を、鋳型として胎盤 cDNA を用いて PCR によって得た。PCR 産物を Spe I / Bam HI で切断し、改変 omp A シグナル配列を含む Spe I / Bam HI で制限処理したベクター pTrec801 に連結してプラスミド pTrec801-Ap om を作製した。プロセッシングされると、この配列はアポミグレンペプチドとなる。

[0319]

14. 4 内皮細胞増殖を阻害するサルモネラ菌によって産生される抗血管新生ペプチド
pTrecOmpA-エンドスタチン、pTrec801-PF4 および pTrec801-13.40 プラスミドを弱毒化腫瘍標的サルモネラ VNP20009 株にエレクトロポレートした。pTrecOmpA-エンドスタチン、pTrec801-PF4 および pTrec801-13.40 を発現するサルモネラ株を、Feldmanら、2000、Cancer Res. 60:1503-1506 および Blezingerら、1999、Nature Biotech. 17:343-348 により記載されてように、抗増殖活性に関してスクリーニングした。各コロニーの培養物 5 ml を 4 時間増殖させた。100 mg/ml ゲンタマイシンを含有する 1/20 容量の HUVEC 培地に細胞ペレットを汚染させ、3 回連続して凍結/解凍サイクルを行うことで細胞溶菌液を作製した。この溶菌液を遠心分離して明澄化し、0.2 mm のシリジフィルターを用いて濾過除菌した。この溶菌液 25 または 50 ml を、100 ml 基本培地 2% FCS および 10 ng/ml FGF を含有する 96 ウェルプレート中のヒト静脈内皮細胞 (HUVEC) に添加した。対照として空の pTrec ベクターを含むサルモネラ菌を用いた。プレートを 72 時間インキュベートし、増殖を MST アッセイによって測定した (Mosmanら、1983、J. Immunol. Methods 65:55-63)。

[0320]

図 19 および 20 で得られた予備の結果は、サルモネラ菌によって産生された血小板第 4 因子ペプチド (PF4-2)、トロンボスポンジンペプチド 13.40 (13.40-3) およびエンドスタチンが 40 ないし 60% の抗増殖活性を有すると思われることが示される。

[0321]

15. 実施例: 弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるバクテリオシンファミリーのメンバーの発現

この実施例はバクテリオシンファミリーのメンバーをコードする核酸を含む、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌がバクテリオシンファミリーのメンバーを発現することができ示す。

[0322]

15.1 COLE3 プラスミドの構築

本明細書に記載のプラスミドは本発明の特定の実施形態の例を示すものである。当業者には明らかなように、trc プロモーターおよび/またはバクテリオシンをコードする核酸のようなプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は、当業者に公知の方法によって他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子と置き換えてもよい。

[0323]

15.1.1. pE3. シャトル-1 (shuttle-1) 中間体ベクタープラスミド

上

pE3. ショトルー1は、複数のクローニング部位及びプラスミドベクターColE3-CA38 (配列番号34) 中へのクローニング/選択のためのlacZ断片を含むカセットを作製するために用いられる中間体ベクターを示す。BRPのE3へのクローニングを容易にするために、BRPを先ず中間体ショトルベクター上にクローニングした(図21)。このベクターは、染色体lacZ中の突然変異(群)を有する細菌株中のラクトースに関してクローニングを選択するために使用できるlacZ断片を含んでいる。次いで、BRP断片を、lacZと相補性断片を含むカセットとして、E3プラスミドSmaI部位(図22)中にクローニングした。lacZ断片によって、このステップにおけるインサートの選択(すなわち、Lac+)が可能になる。天然に存在するE3プラスミドは、抗生物質選択マーカーを有していない(図23)が、プラスミドの存在の選択は、ハローアッセイ(halo assay: Pagsley, A. P. 及びOudega, B., "Cloning and Their Plasmids" (Methods for Studying Colicins and Their Plasmids)", [Plasmids, a Practical Approach] 1987, K. G. Hardy編集; Gilson, L. 及びEMBO J. 9:3875-3884)を用いることによって可能である。このショトルベクターは、BRPのE3プラスミド上へのクローニングだけでなく、E3又はE3/BRPと組み合わせうる任意のDNAのクローニングをも容易にするはずである。次いで、新規なE3/BRPプラスミドを、41.2.9中に形質転換し、活性を試験した。予備的なハロー形成アッセイ(halo forming assay)によって、プラスミド上のBRPの存在が、この株のE3を産生する能力を妨げないことが証明された。41.2.9 E3/BRPが、41.2.9 E3を超えて活性を増大させたか否かを判定するため、各株によって産生されたE3の致死ユニット量を測定した(図24)。41.2.9 E3/BRPは、41.2.9 E3単独よりも100%多い致死ユニットを産生し、これにより、この株が41.2.9 E3単独を超える増大した活性を有することが証明された。

[0324]

15. 1. 2. E3活性に関するハロー「芽刺」アッセイ(halo "stab" assay)

感受性試験株(SK522)を、OD₆₀₀が0.8になるまで増殖させる。試験株10³⁰ 0 µlを、(100×15 mmディッシュに対して)3 mlの加温した(約55℃)LB軟寒天に添加し、素早くLB寒天プレート上に注ぐ。このプレートを穏やかに揺とうしてプレート全体に均一に広げ、寒天を10~15分間かけて固化させる。E3活性アッセイが望まれる大腸菌又はサルモネラ(Salmonella)のコロニーを、滅菌したつまようじ(toothpick)で単離し、寒天中に「芽刺(stabbed)」する。次いで、この寒天プレートを、逆さまにして37℃で一晩インキュベートする。次の日、分泌されたコリシンE3が感受性株を殺傷するので、ハロー又は透明領域(clearing zone)がE3芽刺の周囲に現れる。コロニーは、さらに誘導されて、アルキル化剤(例えば、マイトマイシン)、紫外線又はX線などの多様なSOS誘導試薬のいずれかによる処理によって、E3の産生又は分泌を増加させることができる。

[0325]

1つのハローアッセイの結果を図25に示す。ある細菌株がベトリ皿上の細菌集(lawn)上で増殖した感受性株の存在下でコリシンを分泌すると、分泌されたコリシンは、外側に広がり(diffuses out)、細菌集中に含まれている細菌細胞を殺傷し、それらを溶解して透明領域又はハローを作りだす。ハローの大きさは、分泌されたコリシン量に対応している。図25に示される結果は、多数の株を示している。colE3-CA38プラスミドを含んでいない株の回りには、ハローは絶対に観察されない。誘導剤(induction)の不存在下では、コリシンはサルモネラ株によって産生される。また、種々のタイプの誘導剤(すなわち、アルキル化剤、紫外線、X線)によって、全てのハローは用量依存的にその大きさを増すという証拠がある。

(77)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0326】

15. 1. 3. 選択的E3コロニーのオーバーレイアッセイ

形質転換体を種々の希釈濃度（1:10, 0.00まで）でLB上にプレーティングし、37℃で2時間増殖させる。次いで、感受性試験株をハローアッセイで上記の様に調製し、軟寒天によってオーバーレイを注ぐ。10分間固化させた後、次いで、プレートを選ばなし、37℃で一晩インキュベートする。次いで、次の日に、透明領域の中央に小さなコロニー（又はコロニー群）を伴って、（バクテリオフィアージのブランクに似た）小さな透明領域が現れる。

【0327】

15. 1. 4. 「ブランク」又はハロー精製アッセイ

次に、上記のオーバーレイ寒天の透明領域の中心の小さなコロニーを、滅菌したパスツールピペットを用いて単離する。目に見えるコロニーが無いが、又は1つのハロー中に複数のコロニー群が有る場合のいずれかの場合には、ハロー全体を滅菌したパスツールピペットで吸い取る。コロニー又はハローを500 μ lのLB中に移す。希釈（1:10, 0.00まで）を行い、LB寒天上に戻し、37℃で2時間増殖させる。次いで、オーバーレイを上述した感受性試験株に注ぐ。次の日、コロニー群の全部又は殆どが、それらの回りにハローを有するはずである。

【0328】

16. 実施例：E3のin vivo注射、及びサルモネラ中のプラスミド保持率（%）の測定

下記実施例によって、in vivoでのサルモネラ中のcolE3-CA38プラスミドの保持を証明する。

【0329】

41. 2. 9（又は41. 2. 9 E3-CA38）のいずれかの注射の30日後の2匹のマウス由来の腫瘍及び肝臓のホモジェネートを、この研究に用いた。下記の記載中において、L=肝臓、T=腫瘍である。4つ全てのホモジェネートをCFUのためにプレーティングし、コロニー群をmsbB PCRによる分析及びコリシン産生のためにかきとった。41. 2. 9に類似するコロニーのほぼ純粋な培養物を全てのホモジェネートから得た。それぞれから、5つのコロニーを、コリシン及びPCR分析のためにかきとった。さらに41. 2. 9 E3肝臓ホモジェネート中のコリシン産生体（producers）及び非産生体の混合集団であるように見える30個のコロニーを、さらなる分析のために、41. 2. 9 E3 T及びLプレートからかきとった。これらの結果に基づいて、41. 2. 9 E3腫瘍及び肝臓由来のさらに100個のコロニーをかき取り、コリシン産生及びmsbB PCRについて試験した。分布及びプラスミド保持率を組み合わせた日付（combined date）から算出した。

【0330】

in vivoでのE3注射、サルモネラ中のプラスミドの保持率（%）の測定の結果を下記表3に示す。

【0331】

【表3】

組織	CFU/ml	組織重量	CFU/gm	コリシン陽性数	msbB PCRでの陽性率（%）	プラスミド保持率（%）
41. 29L	1.07E+03	1.33	4.02E+03	6/5	100%	n/a
41. 29T	1.26E+07	0.26	2.42E+08	6/5	100%	n/a
41. 29E3L	1.15E+04	2.34	2.46E+04	87/135	100%	84.44
41. 29E3T	1.09E+06	0.35	1.56E+07	134/135	100%	99.26

【0332】

colE3プラスミドがin vivoで効果を有するようにするため、及びそれがin vivoで腫瘍部位に他の遺伝子を運送するために、colE3プラスミドは、in vivoで効力を有するように保持されていなければならない。エフェクターの標的は腫瘍であるので、この実験で得られた結果は、驚くべきことであり、また利点を有し、従って、肝臓それ自体への影響は少ないであろう。

[0333]

17. 実施例：M27肺腫瘍モデルでの種々の41.2.9株の腫瘍標的化
下記実験によって、41.2.9 colE3及び41.2.9 colE3 BRP及び41.2.9 colE3 BRP-m (改変BRP) サルモネラ株の腫瘍を標的とする能力を証明する。

[0334]

下記表4に列挙されたサルモネラ株をM27肺腫瘍を有する動物に注射し、動物を7日目に犠牲にした。臓器重量を、cfu/gの算出のために、次の日にアッセイした。腫瘍及び肝臓をホモジネートし、msbE上に置き、コロニー形成単位(c.f.u.)を測定した。グループ1、2、4、及び6では、全ての株が、肝臓では $6 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ cfu/gの範囲で種々の蓄積量を伴って、腫瘍中では約 4×10^4 cfu/gまで蓄積された。表4は、全てのグループのデータをまとめたものであり、平均cfu/gで示されている。全ての株が良好な腫瘍蓄積量(10^4 c.f.u./グラム組織より良好)を有することが見出され、全ての株が正の腫瘍対肝臓比を与えた。BRP colE3は、最良の比を有するが、他の全ての利用可能な株よりも必ずしも良好ではなかった。E3及びE3 BRP株は、腫瘍対肝臓比が100~200:1の間で腫瘍において相当に高い濃度まで蓄積する。

[0335]

[表4]

グループ	株	腫瘍 (T) 肝臓 (L)	cfu/g 組織	比 (腫瘍:肝臓)
1	41.2.9/E3	T	$5.1 \pm 1.1 \times 10^5$	131:1
1	41.2.9/E3	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^3$	
2	41.2.9/E3 BRP	T	$4.6 \pm 2.7 \times 10^5$	209:1
2	41.2.9/E3 BRP	L	$2.2 \pm 1.8 \times 10^3$	
6 ¹	41.2.9/E3BRP _m	T	$3.5 \pm 0.15 \times 10^5$	90:1
6 ¹	41.2.9/E3BRP _m	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^3$	

¹: BRP_mとは、96位(GからAへの変異であり、グリシンからアルギニンへのアミノ酸変化をもたらす)及び114位(TからAへの変異であり、セリンからスレオニンへのアミノ酸変化をもたらす)での点突然変異を含む改変BRPをいう。突然変異体BRP_mは、もはや同様の溶解(quasi lysis)を起こさないが、まだ細菌からのタンパク質分泌能を有する(van der Wal, F., Koningsstein, G., Ten Hagen, C.M., Oudega, B.及びLuirink, J. (1998)、大腸菌によるバクテリオシン放出タンパク質(BRP)伸くタンパク質放出の最適化:タンパク質放出から致死率及び同様の溶解を切り離すためのpC10DF13誘導性BRP遺伝子の無作為突然変異(Optimization of Bacteriocin Release Protein (BRP)-Mediated Protein Release by Escherichia coli: Random Mutagenesis of pC10DF13-Derived BRP Gene to Uncouple Lethality and Quasi-Lysis from Protein Release), Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, pp. 392-398)。

[0336]

(79)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

18. 実施例：C38ネズミ大腸癌への41.2.9/ColE3の効力

下記実施例によって、C38ネズミ大腸癌の増殖を阻害する41.2.9/ColE3の能力を証明する。

【0337】

大腸38腫瘍断片(2×2×2mm³)を、C57BL/6マウス(雌、9週令)の皮下に埋め込んだ。腫瘍の体積が1,000mm³に達した後、滅菌条件下でマウスから腫瘍を除去し、小さな断片(約2×2×2mm³/断片)に切断し、上記操作を5回繰り返した。腫瘍埋め込みの0日に腫瘍埋め込み針(tumor implantation needle)を用いて、断片をマウスの右脇腹の皮下に埋め込んだ。

【0338】

腫瘍体積が150~200mm³に達したときに、動物をサルモネラ投与の0日目に無作為化した。凍結保存されていた41.2.9及び41.2.9/ColE3を室温で解凍し、PBSで希釈してそれぞれ最終濃度7.5×10⁶cfu/mlとした。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート(1.5×10⁶CFU/マウス)を、0日目に記載のグループのマウスに静脈内投与した。細菌懸濁液を1×10⁵CFUまで希釈し、msbBプレート上にプレATINGし、一晚インキュベートして、投与された細菌cfuの数を測定した。実験の終わりまで、週2回腫瘍を測定した。各グループ(ColE3)の3つの腫瘍を解剖し、cfu及びプラスミドの保持率を測定するために処理した。

【0339】

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール	8
2.	41.2.9 (1.5×10 ⁶ /マウス)	8
3.	41.2.9/ColE3 (1.5×10 ⁶ /マウス)	8

【0340】

41.2.9/ColE3のC38ネズミ大腸癌への効力の結果を図26に示す。このデータは、VNP20009(41.2.9)の静脈内注射によって処置されたマウスがC38ネズミ大腸癌の増殖を有意に阻害することができることを証明している。さらに、マウスをColE3プラスミドを含有するVNP20009で処置すると、腫瘍退化(すなわち、腫瘍が、実験の初めよりも実験の終わりの方が小さい)が達成された。

【0341】19. 実施例：ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対するVNP20009/ColE3の抗腫瘍活性

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9に対するDLD1ヒト大腸癌の増殖を阻害する、サルモネラ突然変異体VNP20009/ColE3(41.2.9/ColE3)の増大した能力を証明する。

【0342】

対数増殖期に増殖したDLD1細胞をトリプシン処理によって除去し、PBSで洗浄し、5×10⁷細胞/ml PBSに再構成した。細胞懸濁液(0.1ml)をヌードマウス(Nu/Nu-CD1雌、9週令; Charles River社より)の右脇腹に、0日目に単回皮下注射した(5×10⁶細胞/マウス)。10匹の動物を各グループで用い、腫瘍サイズが300~400mm³に達する、腫瘍埋め込みの約10~15日後に無作為化し、供試した(staged)。サルモネラ突然変異体41.2.9及び41.2.9/ColE3のCFUを1日前に計数した。細菌(41.2.9及び41.2.9/ColE3)を1×10⁷CFU/mlに希釈した。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート(2×10⁶CFU/マウス)を、所定の日にマウスに皮下注射した。細菌懸濁液を1×10⁵CFUに希釈し、各希釈100μlをmsbBプレート上にプレATINGし、このプレートを一晚インキュベートした。次の日に細菌コロニーを計数した。腫瘍は、週2

(80)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

回測定した。

【0343】

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール (PBS)	10
2.	41.2.9 (2×10^6 /マウス)	10
3.	41.2.9/ColE3 (2×10^6 /マウス)	10

ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対する41.2.9/ColE3の抗腫瘍活性¹⁰の結果を図27に示す。コリシンE3含有41.2.9株は、41.2.9株単独に比べて増大した活性を示す。

【0344】

20. 実施例: C57BL/6マウスのE16ネズミ黒色腫に対する41.2.9/ColE3の効力

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9/ColE3の、E16-F10黒色腫の増殖を阻害する能力を証明する。

【0345】

対数増殖期で増殖するE16-F10細胞を、トリブリン処理によって除去し、PBSで洗浄し、 5×10^6 細胞/ml PBSに再構成した。細胞懸濁液 (0.1ml) をC57BL/6マウス (雌、9週令) の右脇腹に0日目に単回皮下注射した (5×10^5 細胞/マウス)。10匹の動物を各グループで用い、腫瘍体積が $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達する9日目に無作為化した。凍結保存されていたサルモネラクローン41.2.9及び41.2.9/ColE3を室温で解冻し、PBSで希釈してそれぞれ最終濃度 $7.5 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ とした。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート ($1.5 \times 10^6 \text{ CFU/マウス}$) を、9日目に所定のグループのマウスに静脈内投与した。細菌懸濁液を $1 \times 10^5 \text{ CFU}$ に希釈し、msbBプレート上にプレーティングし、一晚インキュベートして、投与された細菌cfuの数を測定した。腫瘍は、実験の終わりまで週2回測定した。

【0346】

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール	10
2.	41.2.9 (1.5×10^6 /マウス)	10
3.	41.2.9/ColE3 (1.5×10^6 /マウス)	10

C57BL/6マウス中のE16ネズミ黒色腫に対する41.2.9/ColE3の効力の結果を図28に示す。データは、41.2.9 (41.2.9) による静脈内注射によって処置されたマウスが、E16ネズミ黒色腫の増殖を有意に阻害できることを証明している。さらに、41.2.9/ColE3によって処置されたマウスは、41.2.9単独に比べて早い時点 (最高37日まで) に腫瘍サイズの有意な減少を示した。より小さい腫瘍サイズは、より容易に他の治療剤 (例えば、化学療法剤及びX線などの照射) の影響を受け易いので、この知見は非常に重要である。

【0347】

21. 実施例: BRPと組み合わせた41.2.9/E3の抗腫瘍効力

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9におけるBRPとE3の共発現が突然変異体の抗腫瘍効力を増加させることを証明する。

【0348】

サルモネラ突然変異体41.2.9におけるBRPとE3の共発現は、*in vitro*で細菌から分泌されるE3の量を増加させる。BRPが*in vivo*でサルモネラから

(81)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

分泌されるE3の量を増加させる場合には、この追加的な細胞外E3が腫瘍細胞に容易に利用可能であり、従ってこれらの細胞に対する細胞毒性を増加させるという仮説を立てることができるであろう。この実験では、4つの動物グループ（グループ当たり10匹の動物）を試験した：

グループ番号	処置
1	コントロール（未処置）
2	41.2.9
3	41.2.9/E3
4	41.2.9/E3/BRP

19

この実験で用いたモデルは、ヒト肺癌系統HTB177とした。細胞を1日目にマウスの脇腹の皮下に埋め込んだ。腫瘍がおよそ500mm³に達した14日目に、動物に上記表に記載の株の1×10⁶cfu、又はグループ1の場合には生理食塩水を静脈内注射により注射した。腫瘍体積は、24日目まで毎週測定した。表5の結果は、41.2.9が単独で腫瘍増殖を阻害でき（40%阻害）、一方、E3との組み合わせは抗腫瘍効力を増大させる（63%）ことができることを示している。しかしながら、E3及びBRPの両者を有する株をこのモデルで用いた場合、抗腫瘍効力はさらに増大し（未処置コントロールに比べて67%阻害）、増大した阻害率は、より早い時点で非常に有意である（表5）。

20

【0349】

【表5】

表5：未処置コントロールと比較した腫瘍増殖阻害率（%）

株	17日目	20日目	24日目
41.2.9	50	38	40
41.2.9/E3	63	58	63
41.2.9/E3/BRP	97	82	67

【0350】

30

結論として、細胞毒性コリシンE3及び機能強化された（enhanced）分泌系BRPの両者を有するサルモネラによる処置によって、未処置コントロール及び41.2.9/E3単独での処置に比べて抗腫瘍効力が増加する。

【0351】

2.2. 実施例：コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組合せ
下記実施例によって、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られるよりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明する。

【0352】

スケジュールは次の通りである：0日目に、100匹のC57B6雌マウス（5～7週令）の身体中心（mid body）の右側の皮下にB16F10黒色腫（5×10⁶細胞/マウス）を投与することによって腫瘍を埋め込んだ。8日目に、コリシンE3含有サルモネラ41.2.9を注射し、12日目及び26日目に、X線を照射した。

【0353】

コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組み合わせの結果を表6に示す。

【0354】

【表6】

40

カテゴリ	n()	1gに対する日	平均	T/C
A sham 15Gy	(6)	12, 12, 18, 18, 18, 21	17	1.0
J 15Gy X線 12dpt, 26dpt	(9)	14, 14, 18, 21, 25, 35, 35, 67, 67	33	1.9
K 41.2.9+15Gy X線 12dpt, 26dpt 退化 41, 2	(9)	21, 28, 35, 35, 56, 60, 60, 60, 67	47	2.8
L 41.2.9/E3+15Gy X線 12dpt, 26dpt 退化 d32	(9)	28, 39, 53, 56, 56, 60, 67, 74, 78	57	3.3

19

【0355】

このデータは、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られるよりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明している。E3は、41.2.9+X線で見られるよりもマウスの生存期間をさらに延長させた。

【0356】

2.3. 実施例：腫瘍標的細菌による細胞傷害性壊死因子の発現

下記実施例によって、腫瘍標的細菌による大腸菌細胞傷害性壊死因子1 (CNF1) の発現を証明する。

20

【0357】

細胞傷害性壊死因子としては、以下に限定されないが、大腸菌細胞傷害性壊死因子1 (CNF1: Falboら, 1993, Infect. Immun. 61:4904-4914)、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) CNF1 (Linら, 1998, Biochem. Biophys. Res. Comm. 250:462-465) 及び大腸菌細胞傷害性壊死因子2 (CNF2: Sugaiら, 1999, Infect. Immun. 67:6550-6557) が挙げられる。また、CNFファミリーとしては、CNF2のN末端部分と、27%の同一の残基及び80%の保存された残基を有するパステラ・ムルチオシダ (*Pasteurella multocida*) 毒素 (PMT) (Oswaldら, 1994, Proc. Acad. Sci. USA 91:3814-3818) も挙げられる。

【0358】

CNF1は、大腸菌196 (ATCC 700336) から、標準的なPCRを用いて、プライマー、(フォワード) 5'-GTGTTCATGAAAATGGGTAACCAATGGCAAC-3' (配列番号35) 及び(リバース) 5'-CACAGAGCTCGCGCTAACACAAACAGCACAAAGGGAG-3' (配列番号36) を用いたPCRによってクローニングした。約3100bpの産物が得られ、タンパク質の発現並びにDNAクローニング宿主として大腸菌を用いるDNAシーケンシングのためにpTrec99aのNcoI及びSacI部位中にクローニングした。DNAシーケンシングは、ユール大学ケックバイオテクノロジー研究室 (Yale University Keck Biotechnology Laboratory) の標準的な方法によって行った。DNAシーケンシングによって、クローン化PCR産物が、3065塩基対のうちの6つのほんの小さな配列変異を有するCNF1であることを確認した。

40

【0359】

CNF1プラスミドを、大腸菌DNAクローニング宿主DH5a及びサルモネラYS1646株 (国際公開第WO99/13053号) 中に電気穿孔した。標準的なLDHアッセイ (Promega社製、マディソン、ウィスコンシン州、Cytotox 96 (登録商標)) を用いて、大腸菌DNAクローニング宿主及びサルモネラYS1649株におけるCNF1の発現を測定した。図29は、CNF含有プラスミドの存在が細胞毒性の増大をもたらすことを示している。続くアッセイを用いて、CNF含有プラスミドを有するサ

50

ルモネラが多核化 (multinucleation) (Ryckeb, 1990, J. Clin. Microbiol. 28:694-699) などのCNF1の他の既知の特性をも示すことを示した。CNF1に暴露したHeLa細胞の核を、光学顕微鏡法によって試験した。図30の結果は、サルモネラ中にCNF1が存在することによって期待される多核化及び細胞肥大 (cell enlargement) がもたらされることを明瞭に示している。

[0360]

24. 実施例：腸腸菌の細菌によるペロ毒素の発現

下記実施例によって、ペロ毒素ABを発現するように遺伝子操作された腫瘍標的細菌によって産生されるペロ毒素ABの細胞毒性を証明する。

[0361]

ペロ毒素 (合成 (syn.) HSC10毒素、シガ (Shiga) 毒素、シガ様毒素、シゲラ (Shigella) 毒素)。この毒素は、コリシン産生大腸菌HSC10株から単離されたものであり、元々はコリシンであると考えられていた (Farkas-Himsley, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (15): 6996-7000)。それは抗腫瘍活性、特に卵巣癌及び脳腫瘍に対する抗腫瘍活性の長い歴史を有しているが、この抗腫瘍活性は、生きている細菌全体ではなく、精製された副産物と関係している。

[0362]

ペロ毒素を、ペロ毒素Iの公開されている配列に基づくプライマーを用いて大腸菌HSC10 (ATCC 55227) からクローニングし、標準的なDNAシーケンシング法を用いて、ユール・ケック・バイオテクノロジー・センター (Yale Keck Biotechnology Center) でのDNAシーケンシングによって確認した。ペロ毒素の発現は、ペロ毒素A及びBサブユニットによる多シストロン性のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下で、BRP遺伝子を用いて達成した。このテトラサイクリン誘導性BRPペロ毒素ABを、msbB遺伝子を用いる染色体組み込みのためのベクター中にクローニングした。

[0363]

24.1. ベクターの構築

24.1.1. ABの増幅及びクローニング

ペロ毒素AB (AB) は、下記プライマーを用いるPCRによって生成した：

H19B-7：フォワード：5'-GTGTCCATGGCTAAAACATTATTA
ATAGCTGCATCGC-3' (配列番号37)；及び
QSTX-R1：リバース：5'-GTGTCTGCAGAACTGACTGAATTG
AGATG-3' (配列番号38)。

[0364]

また、これらのプライマーは、ptrc99AのNcoI及びPstI部位中にクローニングするための外側のNcoI (5') 及びPstI (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。

[0365]

24.1.2. TetBRPの増幅及びクローニング

TetBRP-ABを、中間体ベクターpSP72-F6/R6中に構築した。TetBRPは、次のプライマーを用いてPCRによって生成した：Tet-5'：フォワード5'-GTGTAGATCTTTAAGACCCACTTTTACATTCTTAAGTTG-3' (配列番号39) 及びBRP-TET-3'：リバース5'-CACAGGATCC TTA CTGAACCGCGCATCCCCG-3' (配列番号40)。これらのプライマーは、pSP72-F6/R6ベクターのBglII及びBamHI部位中にクローニングするためのBglII (5') 及びBamHI (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。

[0366]

24.1.3. pSP72-F6/R6-TetBRP中へのABのサブクロニング
 ptre99A-ABを、pSP72F6/R6-TetBRP中に挿入するためにBamHI及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化してABを除去し、また、BamHI及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化した。pSP72F6/R6ベクターは、トランスで (in trans) lacZ- α 相補性のための β -gal 遺伝子の部分の他に、クロニングのための複数の制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。ベクター (pSP72F6/R6-TetBRP) 及びABインサートの両者は、0.8% 1XTA E Agaroseゲル上で分離し、キアゲン (Qiagen) ゲル抽出キットを用いて精製した。T4リガーゼを用いて、ベクター及びインサートを連結し、熱ショック法を用いて DH5a 大腸菌細胞中に形質転換した。この細胞を、100 μ g/ml の Amp 及び 40 μ g/ml の X-gal を含有する LB プレートにプレーティングした。アンピシリン耐性及び機能性 β -gal 遺伝子の存在に基づいて陽性コロニーを選択した (陽性コロニーは青色だった)。

[0367]

24.1.4. pCDV442中へのTetBRP-ABのサブクロニング
 pSP72F6/R6-TetBRP-ABを、pCVD442ベクター中にサブクロニングするためにNotI及びSfiI制限エンドヌクレアーゼで消化し、また、NotI及びSfiI制限エンドヌクレアーゼで消化した。

[0368]

24.1.5. msbB染色体ベクター

VNP20009株の染色体中のDmsbB遺伝子との相同組換えを行うことができるベクター (国際公開第WO99/13053号中のa.k.a. YS1646) を、自殺ベクターpCVD442 (Donnenberg及びKaper, 1991, Infection and Immunity 59: 4310-4317) 中に構築した。2つの別の産物としてVNP20009中に存在するmsbB欠損の5' 及び3' 側切片の部分を生産する。PCR用のプライマーを設計した (msbB-5': フォワード5' -GTG TGA GCT CGA TCA ACC AGC AAG CCG TTA ACC CTC TGA C-3' (配列番号41) 及びリバース5' -GTG TGC ATG CG GGG GCC ATA TAG GCC GGG GAT TTA AAT GCA AAT GTC CGC CGA AAC GCC GAC GCA C-3' (配列番号42) : 並びにmsbB-3': フォワード5' -GTG TGC ATG CGG GGT TAA TT A AGG GGG CGG CGC CGT ATT GGT TGA ACC GAC GGT GCT CAT GAC ATC GC-3' (配列番号43) 及びリバース5' -GTG TCT CGA GGA TAT CAT TCT GGC CTC TGA CGT TGT G-3' (配列番号44))。また、これらのプライマーは、これらの2つの断片が共通のSphI部位を介して結合するときに、pCVD442のSacI及びSalI部位中へのクロニングを容易にするために、外側のSacI (5') 及びAcaI (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含み、抗生物質耐性を伴わない安定な染色体組み込みのためのDNA断片のDmsbB中へのクロニングを容易にするために、内部のNotI、PacI、SphI、SfiI、SwaI及びDraIを生成する (図31)。このベクターをpCVD442-msbBと呼ぶ (図32及び33を参照されたい)。

[0369]

Tet-BRP-ABをpCVD442-msbB中にクロニングするために、Tet-BRP-ABプラスミドDNAを制限消化し、適当なDNAを精製し、T4リガーゼを用いて、これら2つの構成要素を含む連結反応を行った。次いで、連結反応物をDH51 pirに形質転換し、コロニーをTet-BRP-ABの存在及び配向でスクリーニングした。Tet-BRP-ABクローンをSM101 pir株 (前記Donnenberg及びKaper, 1991) 中に形質転換し、そのプラスミドをpCVD442-Tet-BRP-ABと称した。SM101 pirのコロニーを、PCRによるTet-BRP-AB遺伝子についてスクリーニングし、サルモネラ株に対する交配ドナー (m

ating donor)として用いるために、SM101ピクローンpCVD442-Tet-BRP-ABを選択した。pCVD442-Tet-BRP-ABを含有するSM101ピクローンを、標準的な方法(Davis, R. W., Botstein, D., 及びRoth, J. R., 1980, 最新細菌遺伝学(Advanced Bacterial Genetics), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)によって、サルモネラYS50101株(Difco MacConkey寒天に対する増強された耐性を有するテトラサイクリン耐性YS82株(前記Lowら, 1999)の自然発生誘導体)と交配し、50 µg/mLのカルベニシリン(carb)及び300 µg/mLのストレプトマイシン(strep)を含むプレート上で選択した。得られたYS50102 10
-pCVD442-Tet-BRP-ABクローンを、PCRによりpCVD442-Tet-BRP-AB遺伝子についてチェックした。

[0370]

24. 2. 41. 2. 9-Tet-BRP-AB株を生産するために染色体に組み込まれたpCVD442-Tet-BRP-ABの41. 2. 9(YS1546)中への送込ドナーとしてYS50102-Tet-BRP-AB株を用い、パテリオファージP2 2(突然変異体HT105/1int-201; Davisら, 1980)によって、カルベニシリン耐性を41. 2. 9に形質導入した。pCVD442由来のbla及びsacB遺伝子の存在によって、DmsbB及びDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子の両者を含む41. 2. 9-pCVD-Tet-BRP-AB-1を喪失carb^r(又はamp^r)suc^r株の選択が可能になる(図33、#3)。41. 2. 9-Tet-BRP-AB-1株をLBスクロース上にプレーティングし、suc^rcarb^r誘導体を選択し、DmsbB遺伝子を除去し、LBスクロース寒天プレートを、NaCl無しで作製する以外は、前記Donnenberg及びKaper, 1991(図33、#4)の方法に従ってDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子を残し、プレートを30℃でインキュベートした。これらのプレート上でコロニーが増殖した後、それらをmsbBプレートにグリッドを据え(gridde)、抗生物質及びスクロースマーカーの両方を欠損したクローンの存在を検出するために、複製をカルベニシリン又はスクロースのいずれかを含有するプレートにプレーティングした。得られたクローンを、PCRによりTet-BRP-AB遺伝子の存在についてチェックした。染色体に組み込まれたTet-BRP-ABを含有し、スクロース感受性及びカルベニシリン耐性を欠損している1つの誘導体を、41. 2. 9-Tet-BRP-ペロ毒素ABと表示した。 30

[0371]

標準的なLDH細胞毒性アッセイ(Cytotox[®] (登録商標); Promega社製、マディソン、ウィスコンシン州)を用いてin vitroで41. 2. 9-Tet-BRP-ペロ毒素ABの細胞毒性を試験した。結果を図34に示す。この結果は、ペロ毒素発現クローン26及び31の毒性特性を証明している。クローン26及び31は、テトラサイクリンで処理しなかったときよりもテトラサイクリンで処理したときの方が有意に高い細胞毒性率(%)を有していた。

[0372]

25. 実施例: 腸腸標的細菌による溶血毒の発現

下記実施例によって、腸腸標的細菌を遺伝子操作して溶血素などの溶血性タンパク質を、構成的に又は誘導性制御下で発現できることを証明する。

[0373]

溶血素は、赤血球細胞を溶解させる能力を有する、周知の細胞毒性タンパク質である(例えば、Beutin, 1991, Med. Microbiol. Immunol. 180: 167-182)を参照されたい)。SheA (Genbank番号EC0238954)は、殆どが野生型大腸菌で見出される、通常は発現されないサイレントな溶血素である(Fernandezら, 1998, FEMS Microbiol. Lett. 168: 85-90)。SheA (a. k. a. hlyE; Genbank番号U5 50

(86)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

7430)は、野生型大腸菌(2507株、ユール大学大腸菌遺伝子保存センター(Yale University E. coli Genetic Stock Center))から、下記プライマー(フォワード)5'-TTTTTTCAT GGCTATTA TG ACTGAAATCG TTGCAGATAA AACGG-3' (配列番号45)及び(リバース)5'-TTTTTTTAAGC TTCCCGGGTC AGACTTCA GG TACCTCAAAG AGTGTGTC-3' (配列番号46)を用いたPCRによって、標準的なPCR条件下でクローニングした。正しいサイズのPCR産物を、部分的に構成性のtrcプロモーター下に置くために、ptrc99a (Pharmacia社製)のNco I及びHind III部位中にクローニングした。また、PCR産物をNco I及びEcoRVによって切断したtet-bgal-Z-termベクター(前記)中にクローニングした。次いで、大腸菌DH5a (Gibco社製)を、そのプラスミドで形質転換し、0.2 µg/mlのテトラサイクリンを添加した及び添加しない血液寒天培地(5%ヒツジ血液を有するトリプシン性ダイズ寒天培地; BioMerieux社製、ロンバード、イリノイ州)にプレティングした。溶血を示すコロニーの周りの透明なハローを含むコロニーを陽性コロニーとして取り上げた。陽性コロニーを標準的なプラスミド精製に付し、サルモネラYS501に形質転換し、再度ハローについてスクリーニングした。

【0374】
構成性のハロー形成を、テトラサイクリンの添加によって又は添加無しにハローが観察される、trc99a構築物について図35(2A及び2B)に示す。テトラサイクリン依存性ハロー形成を、テトラサイクリンの添加を伴わずにハローが観察されない、テトラサイクリン-プロモーター誘導性SheAについて図35(3A及び3B)に示す。これらの結果は、腫瘍様の細菌が、構成的に又は誘導性制御下で、溶血性タンパク質を発現できることを証明している。

【0375】 26. 実施例: 腫瘍様の細菌によるメチオナーゼの発現

下記実施例によって、サルモネラなどの弱毒性腫瘍様の細菌を遺伝子操作して、メチオナーゼを発現させることができることを証明する。

【0376】
メチオナーゼは、腫瘍増殖に必要な必須アミノ酸であるメチオニンを分解する酵素である。腫瘍増殖を阻害するための又はメチオナーゼをコードするDNA若しくはウイルスベクターを投与するための精製メチオナーゼの投与に関しては報告されている(Xu及びTanによる国際公開第WO00/29589号)。Xu及びTanは、メチオナーゼの送達のための腫瘍特異的細菌ベクターの使用法を開示しておらず、精製タンパク質によって効力を達成するためには、大量のメチオナーゼが必要である。メチオナーゼを直接腫瘍に送達する新規な方法は、腫瘍様の細菌を用いて酵素を発現させる。

【0377】
Genbank番号L43133に基づくニュードマス・プティダ(Pseudomonas putida)から、下記プライマーを、メチオナーゼ用に生成した:
フォワード:METH-XHOI
5'-CCGCTCGAGATGCACGGCTCCAACAAGCTCCCA-3' (配列番号47); 及び
リバース:METH-BAM
5'-CGCGGATCCTTAGGCACTCGCCTTGAGTGCCTG-3' (配列番号48)

上記例挙げたプライマー(4 mM)及び鋳型として、ニュードマス・プティダの単離されたコロニーを用いて、メチオナーゼの配列を下記条件下でのPCRによって増幅した:
94℃、5分間を1サイクル、次いで94℃にて1分間、60℃にて1分間及び72℃で2分間を35サイクル。72℃、10分間の最終増幅工程は、PCR反応の最後の工程として行った。PCR産物を0.8%TAEアガロースゲル上で分離し、メチオナー

ゼの予想されるサイズ (約 1196 bp) からなる PCR 産物を同定した。バンドを、ゲルから切り取り、キアゲンゲル抽出キットを用いて精製した。

【0378】

pSP72 ベクター及び上記で得られた単離したゲル精製メチオナーゼ遺伝子の両者を制限酵素 Xho I 及び Bam HI で消化した。消化したベクター及びメチオナーゼを、0.8% LXTA 琼脂糖ゲル上で分離した。線状化ベクターに対応する消化生成物及び消化されたメチオナーゼ遺伝子をゲルから切り取り、キアゲンゲル抽出キットを用いて精製した。線状化ベクター及びインサート (メチオナーゼ) を T4 リガーゼを用いて一塩に連結した。連結混合物を、熱ショック法によって D_h5a 大腸菌細胞中に形質転換した。細胞を、回収した後、100 mg/mL のアンピシリン (Amp) を含有する LB 培地にプレートングして、完全な pSP72 ベクターを含有する細胞を選択した。Amp 耐性コロニーを同定し、キアゲンミニプレップキット (Qiagen mini-prep kit) を用いたプラスミド調製並びに酵素 Eco RI 及び Bsp HI による制限消化によって、メチオナーゼ遺伝子を含有する pSP72 ベクターの存在を確認した。クローン #9 を、配列決定のために、エル大学医学部 (Yale University School of Medicine) のエール・シーケンシング・ファシリティ (Yale sequencing Facility) に送った。SP6 (フォワード) 及び T7 (リバース) シーケンシング・プライマーの両者を用いて配列決定がなされた。結果は、配列が、PCR によって TAA に変わっている TGA 停止コドンを除いて、公表されているメチオナーゼの配列と 100% 一致することを証明している。

【0379】

メチオナーゼ活性は、Hori ち, 1996, Cancer Research 56: 2116-2122 に記載のメチオナーゼアッセイを用いて測定できる。

【0380】

27. 実施例：弱毒化腫瘍標的細菌での TAT 融合物としてのアポチン (apoptin) タンパク質の発現

下記実施例によって、弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作して、エフェクター分子、並びに TAT、アンテナペディア (antennapedia)、VP22、及びカポジ (Kaposi) FGF MTS などのフェリー・ペプチド (ferry peptide) を含む融合タンパク質を発現させ分泌させることができることを証明する。

【0381】

27.1. TAT-アポチンベクターの構築

カナリヤ・ウイルス (CAV) タンパク質であるアポチンは、アデノウイルスベクターによって送達されたときに、新生物細胞中でアポトーシスを誘導することが知られている (例えば、Noteborn, 1999, Gene Therapy 6: 882-892 を参照されたい)。

【0382】

サルモネラの細胞質中で転写されるが、腫瘍細胞の核に輸送され、アポトーシスを引き起こす能力を有するタンパク質を生産するために、アポチンタンパク質をヒト免疫不全ウイルス (HIV) TAT タンパク質から誘導されるペプチドに融合した (例えば、Schwartz, 1999, Science 285: 1569-1572 を参照されたい)。TAT タンパク質融合物は、正電荷を増加させ、タンパク質精製を容易にもするポリヒスチジン (ヘキサヒスチジン) アミノ酸と融合した場合に、機能性であることも示されているので (前記 Schwartz, 1999)、TAT-アポチン融合物、ヘキサヒスチジンによって及びそれ無しで生産した (図 36A 及び B)。さらに、TAT-アポチン融合物は、OmpA-8 L シグナル配列によって及びそれ無しに生産できる (図 36A 及び C)。

【0383】

アポチン及びヘキサヒスチジン・アポチンは、オーバーラップ・オリゴヌクレオチドを用いて構築される。アポチンをコードする核酸配列は、下記オリゴヌクレオチドを用いる P

(88)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

CRによって生成した：

TAP1: 5'-GATCCCATGG CTATGOCAG AAAAAACGC CGTCAGCGCC
GTCOCATGAA CGCGCTGCAG GAAGATAACC CGCCGGGCC GTCCACCGTG
TTTCGCCCGC CG-3' (配列番号 49)

TAP2: 5'-GGGACAGGGT GATGGTGATG CCCGCGATGC CGATGCGGAT
TTCGCGGCAA TCGCGGGTTT CCACCGGCG CGAGGAGGTC GCGCGCGCAA
ACACGGTGA CGG-3' (配列番号 50)

19

TAP3: 5'-GGCATCGCG GCATCAACCAT CACCCTGTCC CTGTGGGGCT
GCGCGAAGCG CGCGCGCCG ACCCTGCGCT CGCGACCGC GGATAACTCC
GAAAAACCG GC-3' (配列番号 51)

TAP4: 5'-GCGATATTCG GACGGATCGC AGGACGGTTT TTTGGACGGC
GGTTTCGGCT GATCGGTGCG CAGATCCGGG ACCTTTTAA AGCCGGTGT
TTCGGAGTTA TCCGCGGTGC C-3' (配列番号 52)

20

TAP5: 5'-CCTCGCATCC GTCGAATAT CGCGTCTCG AACTGAAAGA
ATCCCTGATC ACCACCAACC CGTCCCGCCC GCGCACCGC CGCCGCTGCA
TCCGCTCTG AAAGCTTCAT C-3' (配列番号 53)

TAP6: 5'-CATGAAGCTT TCAGAGGCGG ATGCAGCGGC GGGCGGTGCG C-3'
(配列番号 54)

TAP 2-TAP 6オリゴヌクレオチド及びTAP 6H1オリゴヌクレオチド
(5'-GATCCCATGG CTCATCACCA TCACCACCAT TATGGCCGA
AAAAACGCCG TCAGCGCGT CGCATGAACG CGCTGCAGGA AGATACCCCG
CCGGGCC-3'; 配列番号 55)

30

を用いて、TAP 2-アポチン融合タンパク質のヘキサヒスチジン含有バージョンをコードする核酸配列を生成した。TAP 6オリゴヌクレオチド及びomp 8LF1オリゴヌクレオチド

(5'-GATCCCATGG CTA AAAAGAC GGCTCTGGCG CTTCGCTCT
TGCTGTAGC GCTGACTAGT GTAGCGCAGG CCTATGGCCG CAAAAACGC
CGTCAGCGCC-3'; 配列番号 56)

40

を用いてPCRにより、TAP 1-TAP 6オリゴヌクレオチドのPCR産物から、TAP 2-アポチン融合タンパク質のomp 8L含有バージョンをコードする核酸配列を生成した。

[0384]

各オリゴヌクレオチドを、4 μM濃度の保存溶液に調製した。予め混合されたPCR反応ビーズ (Pharmacia社製、Ready-to-go beads) を用い、各オリゴヌクレオチドの2 μlを使用した。PCR反応は、95℃で5分間を1サイクル：95℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間を35サイクル；及び72℃で10分間を1サイクルから構成されていた。次いで、PCR産物を、フェノール/クロロホルムで

50

抽出し、エタノールで沈殿させ、水中に再び溶解し、Neo I及びHind IIIによる制限消化に付した。制限消化されたPCR産物を、ゲル電気泳動によって分離し、正しいサイズの産物(TAT-アポチン及びヘキサヒスチジン-TAT-アポチンに対して、それぞれ約420及び450bp)をゲルから切り取り、標準的な分子生物学的方法を用いて単離した。これらの産物をNeo I及びHind III消化されたptrc99a (Pharmacia社製)中に連結し、ptrc99a-TAT-アポチン構築物を得た。TAT-アポチン(図37)及びヘキサヒスチジン-TAT-アポチン(図38)の両者の正しいDNA配列を得た。

【0385】

27. 2. TAT-アポチンの分泌及び取り込みの証明

10

弱毒性腫瘍標的細胞を、当業界で公知の標準的な方法によって(例えば、熱ショック又は電気穿孔によって)ptrc99a-TAT-アポチン構築物によって形質転換し、培地中で培養する。当業者に公知の方法(例えば、ウェスタンブロット分析又はELISA)を用いて、TAT-アポチンの存在について、細菌培養物からの上清を試験する。一旦、細菌培養物の上清中のTAT-アポチンの存在が確認されたなら、細菌培養上清を哺乳動物細胞(例えば、NIH3T3、CHO、293、及び293T細胞)と共にインキュベートし、細胞内部のTAT-アポチンの存在を、当業者に公知のアポチンアッセイによって確認する。

【0386】

27. 3. 腫瘍内へのTAT-アポチンの取り込みの証明

20

TAT-アポチン又はアポチンを発現するように遺伝子操作された弱毒性腫瘍標的細胞を、B16腫瘍モデルに静脈内投与する。マウスは、細菌の投与後数日で犠牲にし、臓器重量を測定する。当業者に公知のアポトシスアッセイ(例えば、DNAラダーリング(DNA laddering)及びフルオレセインin situ細胞死検出キット(Biohringer Mannheim社製、マンハイム、ドイツ)を用いてTAT-アポチン又はアポチンの存在及び局在について腫瘍をアッセイする。さらに、腫瘍のサイズをアッセイし、TAT-アポチンの抗腫瘍活性を測定する。また、腫瘍をホモジェネートし、プレーティングして、コロニー形成単位(c. f. u.)を測定する。

【0387】

28. 実施例：マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009と化学療法剤との組合せの効力

30

下記実施例によって、化学療法剤と組み合わせた弱毒性腫瘍標的細胞の投与が、相乗的又は相加的に働いて、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを証明する。

【0388】

28. 1. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とサイトキサン(cytosan)又はVNP20009とマイトマイシンCとの組合せの効力

液体窒素保存されたM27ネズミ肺癌細胞(1×10^6 /ml \times 1ml)を、37℃で細胞を素早く解凍することによって正常な状態に戻し、37℃、5%CO₂で10%ウシ胎仔血清(FCS)を含有するDMEM培養培地10mlで培養した。細胞を2世代継代させた後、対数増殖期にあるM27細胞をトリプシン処理によって取り出し、1×PBSで洗浄し、腫瘍埋め込みのために、1×PBSで 2.5×10^5 細胞/mlに再構成した。M27細胞懸濁液を、0日目、100匹のC57BL/6マウス(雌、8週令、20g; 5×10^5 細胞/マウス)の右脇腹の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが10匹のマウスからなるように、無作為に10のグループに分けた。

【0389】

サルモネラVNP20009株を、本発明者の標準的な希釈方法によって、1×PBSで 5×10^6 CFU/mlに希釈した。各マウスに、下記表6に従って12日目に、希釈したサルモネラ(1×10^6 CFU/マウス)0.2mlを静脈内投与した。注射した細菌の実数を測定するため、 5×10^6 CFU/mlの細菌懸濁液を、さらに 1×10^5 CFU/mlに希釈し、栄養寒天培地(MsbBプレート; 国際公開第WO99/13053

50

(90)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

号)上にプレーティングした。形成されたコロニーを翌日計数した。

【0390】

マイトマイシンC (Sigma社製)及びサイトキサン (Sigma社製)を、下記表7に従ってマウスに投与した。マイトマイシンCの2回目の用量を22日目に組み合わせグループには投与したが、腫瘍のサイズが大きいために、マイトマイシンC単独で処置されたグループには投与しなかった。VNP20009+サイトキサンで処置したグループで、重篤な中毒反応が観察されたので、シプロ (Cipro; Bayer Inc. 社製、ウェストハーベン、コネチカット州) 200mpkを、VNP20009単独又はVNP20009+化学療法剤で処置した各マウスに投与した。実験の終わりまで、腫瘍体積を週2回測定した。動物の行動、外観及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定温度の実験室に保持した。床敷きを週2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与えた。

【0391】

【表7】

グループ	マウス数
未処置コントロール	10
3 mpk マイトマイシンC、静脈内、15日	10
5 mpk マイトマイシンC、静脈内、15日	10
150 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
200 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+	10
3 mpk マイトマイシンC、静脈内、15及び22日	
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+	10
5 mpk マイトマイシンC、静脈内、15及び22日	
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+	10
150 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+	10
200 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	

【0392】

図39に示すように、VNP20009+サイトキサンによる組み合わせ処理は、VNP20009処置単独又はサイトキサン処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。図40に示すように、VNP20009+マイトマイシンCの組み合わせは、マイトマイシンC単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。しかしながら、VNP20009+マイトマイシンCの組み合わせは、VNP20009処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害しなかった (図40)。これらの結果は、化学療法剤と組み合わせた弱毒性腫瘍標的細菌の投与が、相乗的又は相加的に働き、腫瘍などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを示している。

【0393】

2.8. 2. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とシスプラチンとの組合せの効力

液体培養保存されたM27ネズミ肺癌細胞 (1×10^6 / $ml \times 1ml$) を、37℃で素早く細胞を解凍することによって正常な状態に戻し、37℃、5%CO₂でウシ胎仔血清 (FCS) を含有するDMEM培養培地25mlで培養した。細胞を2世代継代させた後、対数増殖期 (約90~95%飽和) にあるM27細胞を、トリプシン処理によって取り出し、1×PBSで洗浄し、腫瘍埋め込みのために、1×PBSで2.5×10⁶細胞/mlに再構成した。M27細胞懸濁液 (0.2ml) を、0日目に、36匹のC57BL

／6マウス（雌、8週令、20g： 5×10^5 細胞／マウス）の右脇腹の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが9匹のマウスからなるように、無作為にグループ分けした。

【0394】

サルモネラVNP20009株を、本発明者の標準的な希釈方法によって1×PBSで 5×10^8 CFU／mlに希釈した。下記表8に従って12日目にサルモネラ（ 1×10^8 CFU／マウス）0.2 mlを、各マウスに尾静脈経由で投与した。注射した細菌の実数を測定するために、 5×10^8 CFU／mlの細菌懸濁液を、 1×10^3 CFU／mlにさらに希釈し、MsbBプレート上にプレーティングした。形成されたコロニーを翌日計数した。

【0395】

細菌注射の2日後の14日目に、マウスにシスプラチンを投与した（下記表8）。シスプラチンを、投与前に、正常生理食塩水で0.5 mg／mlに希釈した。腫瘍体積は、実験の終わりまで週2回測定した。動物の行動、外観及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定温度の実験室内に保持した。床敷きは週2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与えた。

【0396】

【表8】

グループ	マウス数
コントロール（未処置）	9
VNP20009、 1×10^8 /マウス、静脈内、12日	9
5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14、19日	9
NP20009、 1×10^8 /マウス、静脈内、12日＋ 5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14、19、33日	9

【0397】

図41に示すように、VNP20009＋シスプラチンによる組み合わせ処置は、VNP20009処置単独又はシスプラチン処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。これらの結果は、シスプラチンなどの化学療法剤と組み合わせた弱毒性腫瘍標的細菌の投与は、相乗的又は相加的に働き、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを示唆している。

【0398】

本発明は、本明細書中に記載された特定の実施態様によってその範囲を限定されるものではない。実際に、先行する記載及び添付の図面から、本明細書中に記載されているものの他に、本発明の多様な変形が存在することは、当業者には明らかであろう。そのような変形は、特許請求の範囲内に入ることを意図する。

【0399】

種々の刊行物が本明細書中で引用されており、それらの開示は、参照によってそれらの全体が本明細書中に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

成熟ヒトTNF- α のコード配列を示す図である。DNA配列（配列番号3）とタンパク質配列（配列番号4）の両方を示す。

【図2】

サルモネラVNP20009 serC株の誘導を示す図である。

【図3】

ネズミチフス菌における、染色体に組み込まれたtrcプロモーター駆動TNF- α 遺伝子からのTNF- α 発現を示す図である。

【図4】

成熟ヒトTNF- α （ヌクレオチド67-543）との合成OmpAシグナル配列（ヌク

レオチド1-63)融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号7)とタンパク質配列(配列番号8)の両配列を示す。

【図5】

大腸菌(JM109株)におけるOmpA/TNF- α 融合タンパク質の周辺細胞質局在化およびプロセッシングを示す図である。

【図6】

成熟ヒトTRAIL(ヌクレオチド67-801)とのOmpAシグナル配列(ヌクレオチド1-63)融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号9)とタンパク質配列(配列番号10)の両配列を示す。

【図7】

大腸菌(JM109株)におけるOmpA TRAIL融合タンパク質の発現およびプロセッシングを示す図である。

【図8】

成熟(C125A)ヒトIL-2(ヌクレオチド64-462)との修飾OmpAシグナル配列(ヌクレオチド1-63)融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号11)とタンパク質配列(配列番号12)の両配列を示す。

【図9】

phoA(8L)またはompA(8L)合成シグナルペプチドに融合した成熟ヒトIL-2の発現およびプロセッシングを示す図である。

【図10】

成熟(C125A)ヒトIL-2(ヌクレオチド64-462)との修飾phoAシグナル配列(ヌクレオチド1-63)融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号13)とタンパク質配列(配列番号14)の両配列を示す。

【図11】

ヒトTNF- α の成熟形態を発現するネズミチフス菌弱毒化株の*in vivo*抗腫瘍効力を示す図である。

【図12】

ERP発現が*in vivo*抗腫瘍効力に及ぼす影響を示す図である。同図は、(1)PBS対照；(2)VNP20009；および(3)BRP遺伝子を含むpSW1プラスミドを保有するVNP20009で治療した、B16黒色腫を有するC57BL/6マウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示したグラフである。

【図13】

サルモネラにおける、pepTプロモーターの制御下での β -gal遺伝子発現の嫌気性菌誘導を示す図である。図13Aは、2株のサルモネラ、YS1456およびVNP20009の嫌気性条件にตอบสนองする β -gal発現の*in vitro*誘導を示す図である。図13Bは、BRP、 β -gal、もしくはBRPと β -galを発現するVNP20009サルモネラの、腫瘍対肝細胞における β -galの*in vivo*誘導を示す図である。

【図14】

サルモネラにおける、Tetプロモーターの制御下での β -gal遺伝子発現のテトラサイクリン誘導を示す図である。用意応答は、約0.15 μ g/mlの濃度までテトラサイクリンに対し線形応答を示すが、これを超えると、応答の低下がみられ、これは恐らく、テトラサイクリンの抗生物質作用によるものと考えられる。

【図15】

pTre99aベクターからのヘキサヒスタジン-エンドスタチン(ヘキサHIS-エンドスタチン)発現を示す図である。図15Aは、サルモネラ(VNP20009)に形質転換させた3つの独立したクローンからのヘキサHIS-エンドスタチンの発現を示す図である。図15Bは、大腸菌(DH5 α)に形質転換させた5つの独立したクローンからのヘキサHIS-エンドスタチンの発現を示す図である。偶数番号のレーンは、非誘導培養物からの抽出物を、また、奇数番号のレーンは、対応するIPTG誘導培養物からの抽出

出物をそれぞれ示す。

【図16】

プラスミドYA3334からのヘキサHIS-エンドスタチンの発現を示す図である。asd系(treプロモーターを用いる)におけるヘキサHIS-エンドスタチンは、抗ヒスチジン抗体を用いたウェスタン分析によりヘキサHIS-エンドスタチン(〜25 kD)の適正サイズのパンドを発現することができる。

【図17】

C38マウス大腸癌に対するエンドスタチンを発現するVNP20009細胞の効力を示す図である。同図は、(1)PBS対照；(2)空のYA3334ベクターを保有するasd⁻VNP20009；(3)ヘキサヒスチジン-エンドスタチンを発現するasd⁻VNP20009；および(4)ヘキサヒスチジン-エンドスタチンとBRPを発現するVNP20009でそれぞれ治療した、確立されたC38腫瘍を有するマウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示すグラフである。

【図18】

DLD1ヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現するVNP20009細胞の効力を示す図である。同図は、(1)PBS対照；(2)空のYA3334ベクターを保有するasd⁻VNP20009；および(3)ヘキサヒスチジン-エンドスタチンとBRPを発現するVNP20009でそれぞれ治療した、確立されたDLD1腫瘍を有するヌードマウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示すグラフである。

【図19】

内皮細胞に対するヒトエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラからの溶解物の抗増殖活性を示す図である。同図は、bFGFおよび 8×10^8 細菌に相当する溶解物に反応するヒト静脈内皮細胞(HUVEC)増殖の阻害を示す。対照として、空のpTrecベクターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4回反復して行なった代表的実験からの平均値である。サンプルを細菌数で基準化した。

【図20】

内皮細胞に対する血小板第4因子ペプチド(血小板第4因子のアミノ酸47-70)およびトロンボスポンジンペプチド(13, 40)を発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラからの溶解物の抗増殖活性を示す図である。同図は、bFGFおよび 8×10^8 細菌に相当する溶解物に反応するヒト静脈内皮細胞(HUVEC)増殖の阻害を示す。対照として、空のpTrecベクターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4回反復して行なった代表的実験からの平均値である。サンプルを細菌数で基準化した。

【図21】

pE3. シェアトル-1ベクターの構築を示す図である。

【図22】

ColE3-CA38ベクター(GenBank登録番号AF129270)の構築を示す図である。ColE3-CA38ベクターのヌクレオチド配列を配列番号1に示す。ColE3-CA38ベクターは、配列番号2〜5にそれぞれ示すように、5つのオープンリーディングフレームを含む。

【図23】

ColE3-CA38/BRP-1ベクターの構築を示す図である。

【図24】

各株によって産生されたコリシンE3の致死単位の量を示す棒グラフである。

【図25】

紫外線またはX線に暴露された各種菌株についてのハロー(halo)アッセイを示す図である。

【図26】

C38マウス大腸癌に対する41.2.9/ColE3の効力を示す図である。

【図27】

NU/ヌマウスにおけるDLD1ヒト大腸癌に対する41.2.9/ColE3の抗

腫瘍活性を示す図である。

【図28】

E16マウス黒色腫に対する41.2.9/Col E3の効力を示す図である。

【図29】

クローン化大腸菌CNF1を発現するサルモネラの細胞毒性を示す図である。

【図30】

CNFに暴露されたHeLa細胞(A)は、正常なHeLa細胞(B)と比べて、腫瘍および多核形成を示す。

【図31】

3'から5'方向(図32のマップからわかるように)のpCVD442-msbBベクターのmsbB部分を示す図であり、該部分は、msbBの中央に欠失を有し、かつその箇所に内部NotI、PacI、SphI、SfiI、SwaIおよびDraIポリリンカーを含む(配列番号61)。図32参照。

【図32】

DmsbB領域にDNAをクローン化し、続いて染色体に挿入するためのpCVD442-msbBベクターの制限マップおよび概略図である。MsbBdelは、DmsbBの5'および3'領域であり；mobRP4は、プラスミドを1つの株から別の株に転移させるための可動化エレメントである。blaは、カルベニシリンおよびアンピシリン等のβ-ラクタム抗生物質に対する感受性を賦与するβラクタマーゼである。SacBは、スクロースに対する感受性を賦与する遺伝子である。

【図33】

1) pCVD442-Tet-BRP-ABベクター、2) サルモネラYS50102におけるDmsbB染色体コピーによる相同的組換え、3) サルモネラYS50102への染色体組込みと、これに続くVNPN20009へのファージ形質導入、4) 株41.2.9-Tet-BRP-ABをもたすスクロース分岐を示す図である。OriRKはプラスミド複製起点であり；mobRP4は、プラスミドを1つの株から別の株に転移させるための可動化エレメントである。ampは、カルベニシリンおよびアンピシリン等のβ-ラクタム抗生物質に対する感受性を賦与するβラクタマーゼである。sacBは、スクロースに対する感受性を賦与する遺伝子である。定尺度で表示していないことに注意。

【図34】

SKOV3細胞(平均数=8)に72時間暴露した後の、陽性および陰性対照(HSC10および41.2.9)と比較したtetBRPABクローン#26およびクローン#31の細胞毒性%を示す図である。ペロ毒素の発現は、テトラサイクリンにより誘導した(クローン26および31を参照)。テトラサイクリン治療あり(+);およびテトラサイクリン治療なし(-)。大腸菌株HSC10は、細胞毒性%の陽性対照として使用した。

【図35】

テトラサイクリンの不在下(1A)およびテトラサイクリンの存在下(1B)で、弱毒性腫瘍標的サルモネラの、血液系系上でのハロー形成を示す。また、テトラサイクリンの不在下(2A)およびテトラサイクリンの存在下(2B)で、構成的にSheAを発現するよう操作された弱毒性腫瘍標的サルモネラについてのハロー形成を示す。さらに、テトラサイクリンの不在下(3A)およびテトラサイクリンの存在下(3B)で、テトラサイクリン誘導性SheAを発現するよう操作された弱毒性腫瘍標的サルモネラについてのハロー形成を示す。

【図36】

(A) ヘキサヒスタジンタグを含まないTAT-アポブチン融合タンパク質を示す。(B) ヘキサヒスタジンタグを含むTAT-アポブチン融合タンパク質を示す。(C) OmpA-8Lシグナル配列を含むTAT-アポブチン融合タンパク質を示す。

【図37】

TAT-アポブチン融合タンパク質のコード配列を示す図である。DNA(配列番号57)

(95)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

）およびタンパク質（配列番号58）の両配列を示す。

【図38】

ヘキサシスチジーン-TAAT-アポブチン融合タンパク質のコード配列を示す図である。DNA（配列番号59）およびタンパク質（配列番号60）の両配列を示す。

【図39】

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/サイトキシン組合せ治療の効力を示す図である。

【図40】

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/マイトマイシン組合せ治療の効力を示す図である。

10

【図41】

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/シスプラチン組合せ治療の効力を示す図である。

【図1】

```

ATG GTA GGT AGC TGC TCT GGC ACT GGC TGC GAT AAG GCG GTT GCT
M T R S S S A T P S D E P V A

CAT GTA GTT GCT AAG GCT GAG GCA GAA GGT GAG CTG TGG CTG
H F Y A N P O A E Q Q L O W L

AAG GGT GGT GGT AAG GCG CTG CTG GCA AAG GGC GTT GAG CTG GGT
H R R A H A L L A D G V E L R

GAT AAG GAG CTG GTG GTA GCT TCT GAA GGT CTG TAC ATC TAT
D H Q L V Y P S E B L Y L I Y

TCT GAA GTA CTG TTC AAG GGT GAG GCG TGC CGC TGG ACT GAT GTT
S Q V L F K G O G C P S T H V

CTG CTG AAT CAC ACC ATC AAG GGT ATT GCT GTA TCT TAC GAG ACC
L L T H T I S R J A V S Y O T

AAA GTT AAG CTG CTG AAG GCT ATC AAG TCT GAG TGC GAG GAT GAA
K V H L L S A I K S P C Q R E

ACG GCG GAG GGT GCA GAA GCG AAA GCA TGG TAT GAA GCG ATC TGC
T P E G A E A K P H Y E P I Y

CTG GAT GCG GTA TTT GAA CTG GAG AAA GGT GAG GGT CTG TGC GCA
L Q B Y F Q L E K G D R L S A

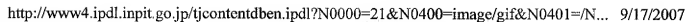
GAA ATC AAG GGT GGT GAT TAT CTA GAT TTC GCT GAA TCT GCG CAG
E I N R P D T L D F A E S G Q

GCG TGC TTC GGT GGT ATT AAG GCA CTG TAA
V Y P S I A L A

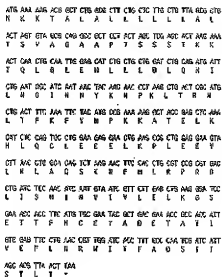
```

【図2】

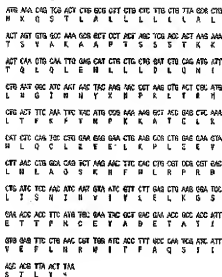




【图 8】



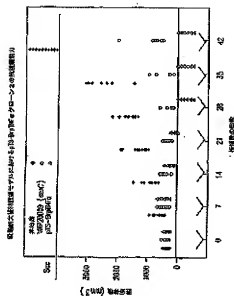
【圖 10】



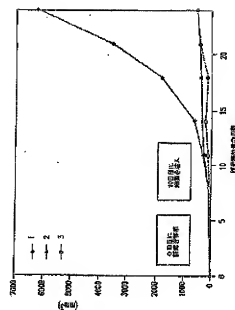
(98)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

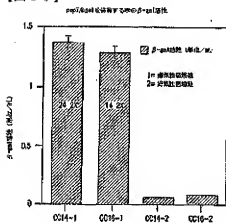
【図11】



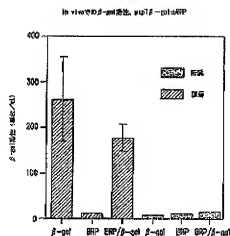
【図12】



【図13】



13A

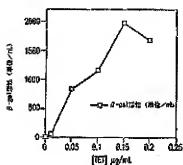


13B

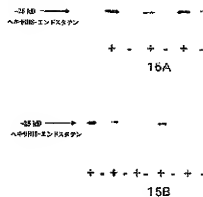
(99)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

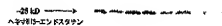
【図 14】

TEIプロローダーを流した5.6- μ mの断面

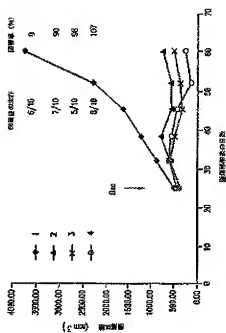
【図 15】



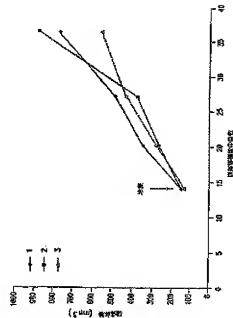
【図 16】



【図 17】



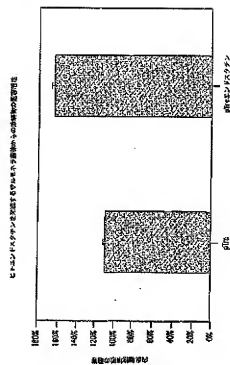
【図 18】



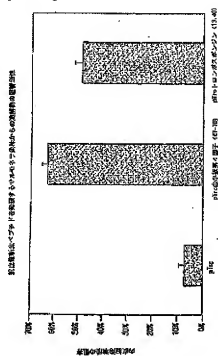
(100)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

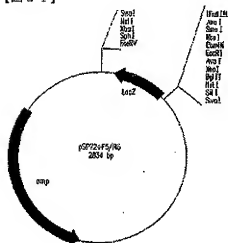
【図 19】



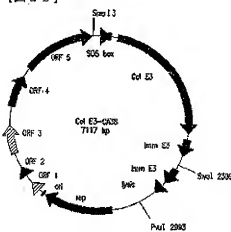
【図 20】



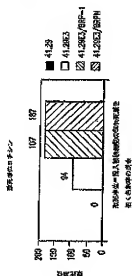
【図 21】



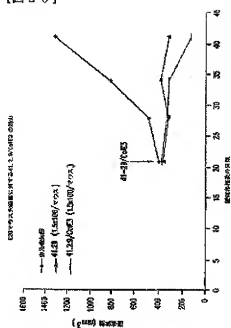
【図 22】



【图 2-4】



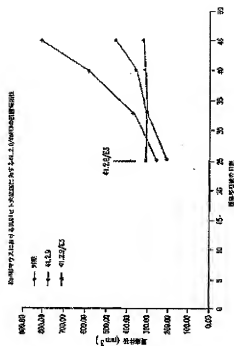
【圖 26】



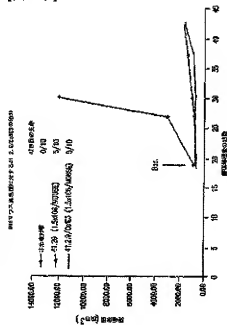
(102)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

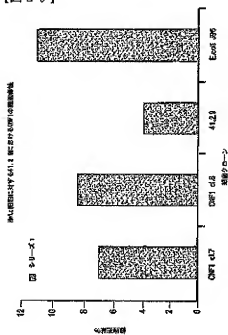
【図 27】



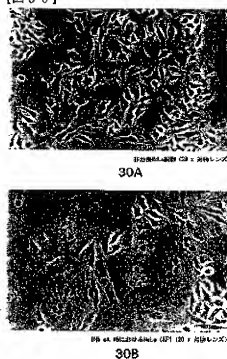
【図 28】



【図 29】



【図 30】



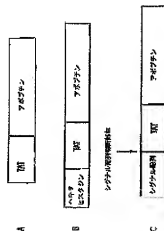
(104)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

【図 35】



【図 36】



【図 37】

図 37-1 図 37-2 図 37-3 図 37-4

図 37-5 図 37-6 図 37-7 図 37-8

図 37-9 図 37-10 図 37-11 図 37-12

図 37-13 図 37-14 図 37-15 図 37-16

図 37-17 図 37-18 図 37-19 図 37-20

図 37-21 図 37-22 図 37-23 図 37-24

図 37-25 図 37-26 図 37-27 図 37-28

図 37-29 図 37-30 図 37-31 図 37-32

図 37-33 図 37-34 図 37-35 図 37-36

図 37-37 図 37-38 図 37-39 図 37-40

図 37-41 図 37-42 図 37-43 図 37-44

図 37-45 図 37-46 図 37-47 図 37-48

図 37-49 図 37-50 図 37-51 図 37-52

図 37-53 図 37-54 図 37-55 図 37-56

図 37-57 図 37-58 図 37-59 図 37-60

図 37-61 図 37-62 図 37-63 図 37-64

図 37-65 図 37-66 図 37-67 図 37-68

図 37-69 図 37-70 図 37-71 図 37-72

図 37-73 図 37-74 図 37-75 図 37-76

図 37-77 図 37-78 図 37-79 図 37-80

図 37-81 図 37-82 図 37-83 図 37-84

図 37-85 図 37-86 図 37-87 図 37-88

図 37-89 図 37-90 図 37-91 図 37-92

図 37-93 図 37-94 図 37-95 図 37-96

図 37-97 図 37-98 図 37-99 図 37-100

図 37-101 図 37-102 図 37-103 図 37-104

図 37-105 図 37-106 図 37-107 図 37-108

図 37-109 図 37-110 図 37-111 図 37-112

図 37-113 図 37-114 図 37-115 図 37-116

図 37-117 図 37-118 図 37-119 図 37-120

図 37-121 図 37-122 図 37-123 図 37-124

図 37-125 図 37-126 図 37-127 図 37-128

図 37-129 図 37-130 図 37-131 図 37-132

図 37-133 図 37-134 図 37-135 図 37-136

図 37-137 図 37-138 図 37-139 図 37-140

図 37-141 図 37-142 図 37-143 図 37-144

図 37-145 図 37-146 図 37-147 図 37-148

【図 38】

図 38-1 図 38-2 図 38-3 図 38-4

図 38-5 図 38-6 図 38-7 図 38-8

図 38-9 図 38-10 図 38-11 図 38-12

図 38-13 図 38-14 図 38-15 図 38-16

図 38-17 図 38-18 図 38-19 図 38-20

図 38-21 図 38-22 図 38-23 図 38-24

図 38-25 図 38-26 図 38-27 図 38-28

図 38-29 図 38-30 図 38-31 図 38-32

図 38-33 図 38-34 図 38-35 図 38-36

図 38-37 図 38-38 図 38-39 図 38-40

図 38-41 図 38-42 図 38-43 図 38-44

図 38-45 図 38-46 図 38-47 図 38-48

図 38-49 図 38-50 図 38-51 図 38-52

図 38-53 図 38-54 図 38-55 図 38-56

図 38-57 図 38-58 図 38-59 図 38-60

図 38-61 図 38-62 図 38-63 図 38-64

図 38-65 図 38-66 図 38-67 図 38-68

図 38-69 図 38-70 図 38-71 図 38-72

図 38-73 図 38-74 図 38-75 図 38-76

図 38-77 図 38-78 図 38-79 図 38-80

図 38-81 図 38-82 図 38-83 図 38-84

図 38-85 図 38-86 図 38-87 図 38-88

図 38-89 図 38-90 図 38-91 図 38-92

図 38-93 図 38-94 図 38-95 図 38-96

図 38-97 図 38-98 図 38-99 図 38-100

図 38-101 図 38-102 図 38-103 図 38-104

図 38-105 図 38-106 図 38-107 図 38-108

図 38-109 図 38-110 図 38-111 図 38-112

図 38-113 図 38-114 図 38-115 図 38-116

図 38-117 図 38-118 図 38-119 図 38-120

図 38-121 図 38-122 図 38-123 図 38-124

図 38-125 図 38-126 図 38-127 図 38-128

図 38-129 図 38-130 図 38-131 図 38-132

図 38-133 図 38-134 図 38-135 図 38-136

図 38-137 図 38-138 図 38-139 図 38-140

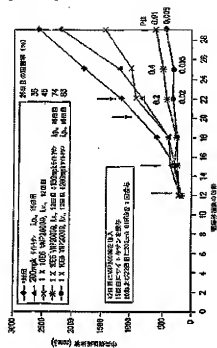
図 38-141 図 38-142 図 38-143 図 38-144

図 38-145 図 38-146 図 38-147 図 38-148

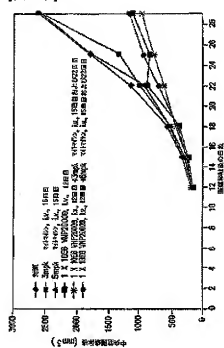
(105)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

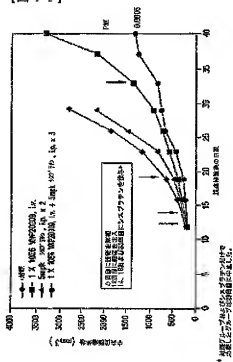
【図 3 9】



【図 4 0】



【図 4 1】



(108)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W0 number

PCT/JP03/03241

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR-TARGETED DELIVERY OF EFFECTOR MOLECULES

This application claims priority to U.S. provisional patent applications Nos. 60/157,566, 60/157,581, and 60/157,603, filed on October 4, 1999, the contents of each of which is incorporated herein by reference in entirety.

1. FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the delivery of one or more primary effector molecule(s) to a solid tumor for the treatment or inhibition of the tumor. More particularly, the invention is related to the preparation and use of intratumorally injected tumor-targeted molecules, such as, e.g., antibodies, as a means for the delivery of one or more primary effector molecule(s) to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the invention encompasses methods of tumor-targeted delivery of one or more primary effector molecule(s) which is utilized to locate one or more primary effector molecule(s). The primary effector molecule(s) of the invention include members of the TNF cytokine family, anti-angiogenic factors, and cytotoxic phytochemicals or peptides. The primary effector molecule(s) of the invention are used, for example, to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, leukemia, or metastases derived from these tumors. The invention further relates to the surprising discovery that primary effector molecule(s) such as TNF family members, anti-angiogenic factors, and cytotoxic phytochemicals or peptides can be delivered directly to tumors by intratumorally injected tumor-targeted molecules with reduced toxicity and without associated complications in the host. The invention also relates to the delivery of one or more additional effector molecule(s) (termed "secondary effector molecule(s)" which may be delivered by the intratumorally injected tumor-targeted molecules in conjunction with the primary effector molecule(s). The secondary effector molecule(s) provide additional pro-tumor therapeutic activity, enhance effects of the primary effector molecule(s) from the intratumorally injected tumor-targeted molecules, and/or enhance uptake of the primary effector molecule(s) at the appropriate site of action, e.g., at the site of a solid tumor.

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

A neoplasm, or tumor, is a neoplastic mass arising from abnormal cell growth, which can be benign or malignant. Despite tumor generally cause localized malignant tumor generally have the potential to invade neighboring neighboring body tissues and spread to distant sites and cause death (for review, see Robins and August, 1996, *Basic*

W04/02287

PCT/GB93/02284

Pathology, 2nd Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 60-122). A mouse is said to have passaged virus if it is spread from one organ or tissue to another.

A major problem is the demonstration of viable tumor carriers for delivery of therapeutic agents, such as drugs, in particular conjugates to eradicate tumor cells while at the same time minimizing damage to normal cells. Thus, studies in many laboratories are directed toward the design of biological delivery systems, such as antibodies, cytokines, and viruses for targeted delivery of drugs, pro-drug converting enzymes, and/or genes into tumor cells (Suz. e.g., Copfel, R.O., 1995, *Immune 27*:385-410).

2.1. CELLULAR IMMUNITY AND CYTOTOXICITY

- One strategy for the treatment of cancer involves vaccinating or activating a cellular immune response. Successful induction of a cellular immune response directed toward a tumorigenic virus effect involves administration of a recombinant retrovirus (1) Immune recognition is highly specific, being directed against highly immunogenic epitopes. Epitopes of a molecule can be recognized through immune surveillance. The diversity of immune response and recognition can compensate for different resistance mechanisms employed by tumor cells: a) clonal expansion of cytotoxic T cells can occur more rapidly than the expanding tumor, resulting in resistance mechanisms which ultimately overtake the tumor; and b) a memory response can suppress disease recurrence in the waiting stages prior to physical detection. Clinical studies of responding patients have been and results from animal models demonstrating that successful immunotherapy involves the activation of CD8⁺ T cells (class I response), although evidence exists for participation of CD4⁺ T cells, macrophages, and NK cells. See, e.g., Chizzoni *et al.*, 1990, *J. Immunol.* 146:1971-1980; Orlitzky *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 102:568-578; Kishimoto *et al.*, 1993, *Int. J. Cancer* 53:254-260; Per *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 58:435-439; Shih *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:3371-3375; and Zelenitsky *et al.*, 1999, *Int. J. Immunol.* 25:294-295.

2.2. TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

FAAMILY BACKGROUND

- The best characterized member of the TNF family is TNF- α . TNF- α is known to cause pleiotropic effects on the immune system. TNF- α is a cytokine which can exert immune stimulant effects directly on target cells. TNF- α is generally thought to exert its immunoregulatory effects via either mechanisms such as upregulation of costimulatory and adhesion molecules, and promotion of apoptosis in target cells (see, e.g., Hargrett *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:1344-1346; and Orlitzky *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:451-457). Promotion of tumor necrosis factor gene expression and upregulation of cellular adhesion molecules and antigen presentation activity, ultimately leading to cell lysis within the tumor (reviewed in Beutler and Cerami, 1989, *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-665; and Vassalli, P.,

WD Fisher

PC1008610224

- JP2, Am. Res. Assoc. 16:411-422). However, in a study of three glioblastoma, synchronous administration of TNF- α results in fatal consequences in the host due to disseminated intravascular coagulation.
- Other cytokines have also been implicated in anti-tumor responses. IL-2 is a direct cytokine and is also thought to play a role in anti-tumor response. For example, spontaneously regressing melanomas have been associated with elevated intratumoral levels of TNF- α and IL-2. See, e.g., Stankovic and Conry, 1997, *Anticancer Research*, 17:623-630; Lemos et al., 1997, *J. Immunol.* 158:516-519; Krieger et al., 1999, *J. Immunol.* 163:1541-1546; Scherz et al., 1997, *J. Immunol.* 158:1795-1797.
- Both TNF- α and IL-2 aid in lymphocyte homing, and IL-2 has been shown to attract tumor infiltrates of natural killer (NK) cells, T-cells, and lymphokine-activated killer (LAK) cells (see, e.g., Shaw et al., 1996, *Cytokines* 10:395-403; Acland et al., 1997, *Br. J. Cancer* 76:371-380; Chen et al., 1997, *J. Neuroimmunol.* 86:511-516; Vira et al., 1998, *Cell. Exp. Immunol.* 106:325-332; Lundholm et al., 1996, *J. Immunol.* 157:326-332; Rasmussen et al., 1998, *Immunol. Rev.* 167:45-56; Johansson et al., 1996, *Nat. Rev. Immunol.* 1:97-97; and Vatanakis et al., 1997, *Am. J. Pathol.* 150:1658-1670). In the presence of both TNF- α and IL-2, the cytolytic activity of NK and LAK cells is increased, even when directed against TNF-inert native cell lines, e.g., *Chomaz et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:433-439). However, therapeutic levels of IL-2 have also been shown to be toxic to the host.
- Clearly, down-regulating toxicity from systemic cytokine administration poses a significant barrier to realizing the potential of cytokines in cancer therapy. Moreover, systemic cytokine delivery can result in decreased homing of cytotoxic T cells, thus opposing targeted immunotherapy, in addition to resulting in unwanted clinical side effects. See *Adelman et al.*, 1998, *Clin. Immun.* 91:149-160; *Adelman et al.*, 1997, *Clin. Cancer Res.* 3:1277-1285; *Becker et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7878-7881; *Becker et al.*, 1996, *J. Neuroimmunol.* 82:30-35; *Caro et al.*, 1993, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119:819-827; *D'Angelica et al.*, 1999, *Cancer Immunol. Immunother.* 47:665-671; *Dreno et al.*, 1996, *Clin. Cancer Res.* 2:1543-1552; *Rasmussen et al.*, 1999, *Stand. J. Immunol.* 47:323-330; *Orntoft et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:4185-4191; and *Stahmiller et al.*, 1994, *Clin. Cancer Res.* 6:2655-2665.

1.5. NOVELLY CYTOKINE

- Recent experimental animal and clinical studies have attempted to bypass systemic toxicity of cytokines and administer higher doses, through sub-cutaneous or intracavitary methods of delivery of cytokines. In murine models, over 1000 times have been shown with administration of a liposomal liposome-encapsulated TNF- α gene, and systemic administration of polyethylene glycol-encapsulated TNF- α , which could be used

W01/022897

PCT/JP00/02282

in the tumor when tumor (see Kawasumi et al., 1976, *Ann. J. Cancer Res.* 87:1876-1885). Immunization of tumors by TMR- α by subcutaneous-injection of polyepitope B has also been reported (see, Murata et al., 1959, *J. Surg. Res.* 4:348-359; Wu et al., 1956, *Cancer Res.* 16:205-212).

- In clinical studies, complete tumor regression has been observed following high-dose TMR- α administration to patients via intravenous perfusion, in concentrations with 100-fold to 1000-fold higher than those used in mice. However, this technique presents severe risks to the patient if the perfusion is not completely stopped following therapy. Further, these compounds regulate host immunity, which, in itself poses a risk to the patient. See Aggarwal et al., 1997, *Breast. Oncol.* 24:147-155; Fisher et al., 1995, *Cancer J. Sci. Am.* 1:122-130; Lejman et al., 1998, *Chin. Opin. Immunol.* 10:273-280; Murata et al., 1996, *J. Surg. Res.* 63:248-252; Mitsunaga et al., 1996, *Cancer Res.* 56:5715-5720; Tsubouchi et al., 1994, *Ann. J. Cancer Res.* 87:1978-1983; and Wu et al., 1956, *Cancer Res.* 16: 205-212.
- Patient studies by Chaudhry et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1156-61; Gellerman et al., 1997, *Cancer Biotech. Biotherapies*, 12:37-45; Salzman et al., 1997, *J. Pediatr. Surg.* 32:1001-1004 have reported the use of intravenous administration to deliver IL-12 (Chen) and IL-2 (Salzman) directly to the tumor and spleen, the natural sites of Salzman's infection, to serve as vectors across to affect lymphoid metastases. Salzman's studies used and administration of Salzman's in which therapy was taken up by OAC1 (an injected lymphoid tumor) and compared to their end organs. However, these infections are limited to the natural sites of infection.

1.1. ANGIOGENESIS AND TUMORIGENESIS

- Another strategy for the treatment of cancer involves the inhibition of angiogenesis. Angiogenesis is the process of growth of new blood vessels from preexisting blood vessels. New capillaries are formed by a process in which the endothelial cells of the preexisting blood vessel, using proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases, degrade the basement membranes in their vicinity, proliferate, migrate into surrounding stromal tissue and form microvessels. The process of angiogenesis is very tightly regulated by an interplay between angiogenic and pro-angiogenic factors, and is tightly regulated by the humoral regulatory system and neural regulatory system (see, 1996, *Clin. Exp. Immunol.* 17:1-14).
- Abnormal or abnormal regulation of angiogenesis has been implicated in many human diseases, including diabetes mellitus, psoriasis, rheumatoid arthritis, cardiovascular disease, and neurodegeneration (Salzman, 1995, *Nat. Med.* 1:27-31).

- Angiogenesis is a critical process for tumor growth and metastasis. Tumor formation is divided into three stages, the pre-neoplastic and neoplastic stages. Studies have shown that cells of aggressive tumor proliferation rapidly in the cells have vascularized tumors. However, pre-neoplastic tumors rarely grow to more than 2-3 mm³ because of the

WO 96/02897

PCT/JP96/01242

existence of an equilibrium between cell proliferation and cell death, the latter resulting from the trophic action of the stromal tumor (Folkman, 1995, *Nat. Med.* 1:27-31). The switch from the pro-survival to tumor stage requires a shift in the balance of the regulatory factors of angiogenesis from a net balance directed against the tumor to one in which the pro-survival factors, such as fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), predominate (Cao, 1996, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 21:161-179). The shift in balance between regulatory factors is a result of the up-regulation of the angiogenic factors and the down-regulation of anti-angiogenic factors (Folkman, 1995, *N. Eng. J. Med.* 333:1557-1563).

2.5. ANGIOGENESIS IN CANCER

Anti-angiogenic factors were probably to exist on the basis of general related phenomena that the tumor endothelium, primary tumor alone inhibited the growth of their metastases (Cao, 1996, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20:163-170). The first of these factors to be isolated was tumor angiogenesis, a 38 kDa proteolytic fragment of plasminogen that is released into the circulation by primary human lung carcinoma tumors and promotes the growth of secondary metastases (O'Reilly et al., 1994, *Cyt* 70:315-328). In contrast, peptides of 40, 42 and 45 kDa retard the growth of primary metastases of plasminogen with immunofluorescence anti-angiogenic factor comparable to tumor angiogenesis (O'Reilly et al., 1995, *Cell* 79:315-328). Plasminogen itself has no such activity. It is also thought that tumor-associated macrophages are responsible for the production of angiogenesis, some tumor cells themselves have no detectable angiogenesis mRNA. Macrophage metalloproteinase expression is induced by growth factor release (O'Reilly et al., 1997, *Cell* 88:591-600). In order to ensure, angiogenesis is catalyzed by active proteases either the metalloproteinases, where metalloproteinase are produced directly by the tumor cells (Carmeliet et al., 1997, *Cancer Res.* 56:6183-6190).

Administration of capstatin at a concentration of 100 mg/kg by intraperitoneal route with primary tumor resection in a strong inhibition of tumor growth without toxic side effects. The tumor regress within 2 weeks of cessation of the angiogenesis treatment, indicating that the tumor regress into a dormant state rather than regrowth due to a result of the treatment (O'Reilly et al., 1996, *Nat. Med.* 2:688-692).

After the discovery of angiogenesis, other angiogenesis inhibitors, including several angiogenesis-inhibiting peptides, were discovered and isolated. A novel potent inhibitor of angiogenesis from angiogenesis is heparin 5, a peptide comprising the fifth heparin domain of plasminogen (angiotensin-converting enzyme 1-6). Kunitz 5 can be produced by the proteolytic cleavage of plasminogen, and recombinant form are also active (Chen et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:22914-22918).

WO 01/287

PCT/GB96/01241

- Endostatin was isolated in a manner similar to the isolation of *reagin* (O'Reilly et al., 1991, Cell 64:1-12), the course being a similar leukogenic pathway rather than a Lewis lung carcinoma. The peptide has the apparent molecular mass of 20 kDa when sequenced correspondingly to the C-terminal of collagen XVIII (O'Reilly et al., 1991, Cell 64:1-12), a region called NC1 that is divergent among various collagen molecules (O'Reilly et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4228-4233; and Klein et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4234-4239). In fact, the growth of Lewis lung carcinoma metastases is correspondingly the subcutaneous 0.3 mg/kg of endostatin solution, and the primary tumor regresses to a dormant state where the peptide is administered in 20 mg/kg/day. Partially recombinant endostatin can be produced from bacteria by other, *in vitro* by denaturation and refolding, or *in vivo* by the controlled release of recombinantly synthesized endostatin from a biodegradable polymer (O'Reilly et al., 1991, Cell 64:1-12). An alternative method of endostatin delivery consisting of intravenous administration of an endostatin expression plasmid vector to study the partial inhibition of tumor growth in a cancer model system (Chakraborty et al., 1995, Mol. Biotech. 17:343-349). Endostatin is an angiogenesis-inhibiting peptide with a mechanism of action that was delivered intravenously resulted in a partial inhibition of tumor growth. It is a natural killer cell of tumor cancer (Chen et al., 1999, Cancer Res. 59:3202-3212).
- Recently, a novel anti-angiogenic activity has been identified in a C-terminal truncated peptide of the *Shiga* (Shiga Protein Inhibitor) anti-tumor (O'Reilly et al., 1999, Science 285:1826-1828). Full length anti-tumor has no inherent anti-angiogenic activity, but upon cleavage of the C-terminal amino acid of the protein by trypsin, anti-tumor requires potent angiogenic activity. The pro-angiogenic fragment is referred to as *Shiga* or *Shiga* anti-tumor.
- Other angiogenesis-inhibiting peptides known in the art include the 20 kDa *N*-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin (Hernandez et al., 1995, J. Am. Physiol. 170:1512-1522), the 16 kDa proteolytic fragment of perlecan (Copp et al., 1990, Biotechnology 13:1120-1122), and the 7.3 kDa proteolytic fragment of fibronectin (Copp et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7159-7163).
- In addition to these naturally produced proteolytic fragments that have been demonstrated anti-angiogenic effects, several synthetic peptides that correspond to regions of known extracellular matrix proteins have been assessed for activity in inhibiting angiogenesis. Synthetic peptides which have been demonstrated to have specific endothelial inhibition, i.e. angiogenesis inhibition, include a 13 amino acid peptide corresponding to a fragment of *Collagen* (O'Reilly et al., 1994, Cancer Res. 54:3077-3082), a 14 amino acid peptide corresponding to a fragment of *Collagen* (I. E. Klein et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511), a 19 amino acid peptide corresponding to a fragment of *Thrombospondin* (Tobias et al., 1999, J. Cell Biol. 122:497-511), and a 20 amino acid

(314)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

with the other

PCV285402241

peptide corresponding to a fragment of SPANIC (Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:152P-153P), a secreted cytosolic-rich extracellular matrix glycoprotein whose up-regulation in human melanomas leads both to enhanced cellular invasion in vitro and reduced tumorigenicity in an in vivo nude mouse model (Lodish et al., 1996, Nature Med. 2:174-176).

Other peptides of less than 10 amino acids that inhibit angiogenesis and are up-regulated in fragments of lamellins, fibronectin, perlecanin, and EGF have also been described (see the review by Cio, 1998, Prog. Mol. Biotech. Med. 20:161-166).

The small fibronectin peptides that inhibit angiogenesis in primary angiogenesis the model EGF. EGF is a positive small fibronectin peptide Arg-Gly-Arg used by peptides for angiogenesis and binding to integrin receptors. The expression of integrin α_5 is associated with angiogenic blood vessels and inhibition of its activity by monoclonal antibodies blocks

vascularization (Strooks et al., 1999, Science 284:569-574). This has been confirmed by a study showing that the administration of cyclic propargyl peptides overexpressing the EGF motif inhibits the activity of fibronectin receptor-type 1 (integrin α_5 β_1) (see the review by Strooks et al., 1999, Nature Medicine 5:529-533). The anti-

angiogenic action of integrin blockers such as cyclic propargyls and monoclonal antibodies has been shown in patients tumor regression by inhibiting the expression of integrin α_5 and another integrin binding motif, RGD (see the review by Strooks et al., 1999, Nature Medicine 5:529-533). The inhibition of the activity of another type of cell surface receptor, namely the

erbB2 tyrosine kinase (HER2) receptor, also results in the inhibition of angiogenesis. The HER2 receptor, upon ligand binding, induces a tyrosine cascade that is necessary for the basement membrane invasion step of angiogenesis. Inhibition of the HER2 receptor by receptor antagonists inhibits angiogenesis, tumor growth (Chen et al., 1994, Cancer Res. 54:2428-2432) and metastasis (Chowdhury et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10281-10285). Such antagonists have been identified by heterologous peptide

display of random peptides (Chowdhury et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7127-7132). Downstream actions of the receptor's ligand, HER2, have also been identified (Bis et al., 1996, Cancer Res. 56:2625-2633).

While the discovery of angiogenic, angiostatic and anti-angiogenic peptides provided an exciting new approach to cancer therapy, the reality of a cure of treatment involving one or more of these peptides in the long-term is the production of resistance

to one or more of these peptides in the long-term is the production of resistance to one or more of these peptides (arising from the constitutive loss of binding to produce, the average person of 60 kg or 140 lbs, approximately 1.3 or 6.7 grams of protein per day, depending on the peptide) and the duration of the treatment (which limits the number of cycles) is to stay in (dependent) in its strength that the two yield, suggest that these peptides have to be administered to each large quantity and that, first, a safety and

WO 02/28287

CCTC0801024

transported in the blood stream and, second, of the endothelial cells which receive degradation only a very limited proportion make their way to the tumor. Thus, it would be a great advantage to the field of tumor therapy if anti-neoplastic proteins or peptides could be delivered more effectively to the tumor and in a more efficient and sustained manner.

5

2.6. BACTERIOCIDAL ACTIVITY

Colicin E3 (denoted by hereinafter as ColE3) is a bacteriocin, i.e., a bacterial proteinaceous toxin with cytotoxic activity, in that it is toxic to its hosts. Bacteriocins may be encoded by the host genome or by a plasmid, may have a broad or narrow range of hosts, and may have a simple structure comprising one or two subunits or may be a multi-domain molecule (Korolik, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 325-345). In addition, a bacteriocin may act as immunity against the bacteriocin. The immunity is found in all cells of a given host population, even those that do not express the bacteriocin.

15

The cytotoxicity of ColE3 results from its inhibition of protein synthesis (Oswanson, 1953, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:215-246). The target of ColE3 activity is the 16S component of bacterial ribosomes, which is common to the 50S and 70S ribosomes (Oswanson et al., 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:668-670), and the activity results in the degradation of the ribosome (Borczyk, 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*). ColE3 acting as unique strong ribosome, further it does not cause the overall degradation of RNA, but causes mRNA subjected to nucleotide transfer and, resulting in the separation of the rRNA from the rRNA and thereby inhibiting translation. The ribosome activity of ColE3 results in its molecular self, either then being excreted by another protein (Gundlach, 1976, *Nature* 261:113-114). ColE3 is also able to promote the base and water accessibility of the target cell.

25

In its naturally occurring form, ColE3 is a 66kDa protein complex consisting of a 50kDa and a 16kDa protein. In a 7:1 ratio, the larger subunit having the nuclease activity and the smaller subunit having the nuclease function of the 50kDa subunit. Thus, the 50kDa protein acts as a nuclease protein for binding, and the 16kDa protein acts as a nuclease. The 50kDa subunit consists of two two subunits, one in the N-terminal region required for localization across target cell membranes, and a C-terminal region with catalytic (3'5'-ATPase) activity. Within the first subunit, the activity of the large subunit is inhibited by the small subunit. The subunit is thought to dissociate upon entry of the toxin into the target cell as a result of interaction with the target cell's outer membrane (examined by Korolik, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:325-345).

35

The toxicity of the large subunit of ColE3 has been well documented in the literature (examined by Korolik, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:325-345). The activity of the large subunit of ColE3 has been well documented in the literature (examined by Korolik, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:325-345). The activity of the large subunit of ColE3 has been well documented in the literature (examined by Korolik, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:325-345).

W0-412869

PCT/JP00/02022

engaged as a chromosomally integrated coding sequence and the large subunit was expressed from a plasmid. Thereby with the chromosomally integrated small subunit we succeeded in producing that express the ColEI large subunit, but when the plasmid copy to be initially transferred to another recipient one (which the small subunit, shared) would be initial.

- 5 Colicin E3 (ColE3) has also been shown to have a profoundly cytotoxic effect on microfilament cells (see Iwamoto et al., 1998, *Mol. Microbiol.* 23: 273-277), involving a helix-coiled coil motif sequence (see Iwamoto et al., 1999, *Bioprocess* 35: 651-657). ColE3 toxicity targets the 40S subunit of the 60S eukaryotic ribosome (Dorsey et al., 1977, *Mol. Biochem. Phys.* 52: 327-334).

10

2.5. BACTERIAL INFECTIONS AND CANCER

- Early clinical observations reported cases in which cervical cancers were reported to regress in patients with bacterial infections, (see Evans et al., 1953, *Ann. Med.* 46: 385-390; Sandberg 1953: 1-161, (Suppl. 276); and Sten, 1950, *J. A.M.A.* 142: 381-383. Since these observations, Lee et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1647-1651 (see et al.) and Jones et al., 1992, *Int. J. Cancer* 69: 2473-2476 (Jones et al.) looked for evidence of *S. typhimurium* that were able to invade 15H-2 (human epidermal carcinoma) cells in vitro or significantly greater numbers than the wild-type strain. The "hyperinvasive" mutants were isolated under conditions of aerobic growth of *S. typhimurium* that normally require the ability of wild-type strains to invade 15H-2 animal cells. However, such hyperinvasive *S. typhimurium* infections as described by Lee et al. and Jones et al. carry the risk of possible bacterial resistance and could lead to wide-spread bacterial infections in the patient.

- Campbell et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 5665-5669, demonstrated that mice infected with intracutaneous Clostridia-Ovaries (BCO) have increased serum levels of TNF and that TNF-positive serum caused regression of the tumors. With a few other immunotherapeutic agents in mice. As a result of such observations, a number of cancer patients with BCO infections is currently utilized in cancer therapy programs. (see Friedman, 1994, *Cancer*, 73: 26-45; Hsu, Burt and Johnson, 1995, *Cancer* 73 (Suppl. 2): 176-179; Filling, 1993, *Mol. Oncol.* 1: 209-216 (see review of BCO therapy).

- However, TNF-coated bacteria are using the pathway to cause cancer associated with bacteria, and one have been isolated as a consequence for the host (Dow, 1993, *BAJCA* 26(1): 142-145; Doherty et al., 1993, *AmJCA* 359: 1120-1123). Further, down-regulation of TNF- α has been the major target in effective clinical use.

- Indefinable which reduce the level of the tumor response could be the lack of TNF- α levels would not be true, and a more effective immunization and/or depletion of the dendritic vector would be used.

-9-

(117)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/02870

PCT/JP98/00241

2.8. **TRANSFERRABLE BACTERIAL**

Genetically engineered *Salmonella* have been demonstrated to be capable of tissue targeting, possess anti-tumor activity and are useful in delivering a therapeutic such as the herpes simplex thymidine kinase (HSV TK) to solid tumors (Peschke et al., WO 96/02218).

2.9. **REVERSE ASIDE PRODUCTION OF THE
REVERSE SIDE PRODUCTION OF THE**

Modified one to the type composition of *Salmonella* if bacteria which after the *Salmonella* is capable of a result of a decreased incidence of TGF- β production were suggested by Peschke et al. (Peschke et al., WO 96/02218). Peschke et al. provided results in the induction of gastric cancer. Bacteria were responsible for the development of a (HSA) infection. HSA was used as a model to study the effect. Peschke et al. also suggested the use of genetic modification to the *Salmonella* in the *Salmonella* pathway, including the mutation of the *hlyA* gene for the first enzyme UDP-3-O-(6-phosphoryl)-adenosine-5-phosphate in *Salmonella* (Kelly et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274:16866-16870). Peschke et al. showed that mutation in the *hlyA* gene reduces tumor levels of TGF- β .

In *Escherichia coli*, the *hlyA* gene is responsible for the normal reproduction of *Salmonella* (Singh et al., 1992, *J. Bacteriol.* 174:4394-4396; Knowlton and Cooper 1999, *J. Bacteriol.* 175:790-793; Sussangkarn et al., 1995, *J. Clin. Invest.* 97:1339-1343). Genetic disruption of this gene results in a surface to surface infection which is less virulent (Sussangkarn et al., 1995, *J. Clin. Invest.* 97:1339-1343; Sussangkarn, WO 97/22961). These mutations, however, do not suggest that disruption of the *hlyA* gene in human *Salmonella* strains would result in bacteria which are less virulent and more suitable for drug delivery.

The problem is solved when the use of bacteria as gene delivery vectors is on the general ability of bacteria to deliver DNA several eukaryotic cells as well as their ability to overcome the immune system via TGF- β which can cause their degradation for the host (Chen, 1992, *JAMA* 268:3432-3435; and Dismore et al., 1993, *JAMA* 269:1818-1825). In addition to these factors, resistance to antibiotics can severely complicate coping with the presence of bacteria within the human body (Chapman, 1996, *D. W. Smith Translational Medicine* 1996 10:275-7; Reeves et al., 1996, *Environ. Biol. Fish.* 44: 545-549).

Here and Peschke, WO 97/22961 ("Here and Peschke"), disclose methods to produce gene-negative bacteria having non-replicative *hlyA* or *hlyB*.

Finally, WO 97/22961, describes a system of *Salmonella* having a mutation in the *hlyA* gene which reduces TGF- β in a host cell as compared to a wild type strain.

- 10 -

W04/012869

PCT/GB98/02294

Bernstein *et al.*, WO 94/13853, teach compositions and methods for the genetic disruption of the *echA* gene in *Salmonella*, which results in *Salmonella* producing a lower ability to elicit TNF α and reduced virulence compared to the wild type. In certain embodiments, these such mutant *Salmonella* have increased susceptibility to chelating agents as compared to wild type *Salmonella*. See also, Low *et al.*, 1999, *Nature Biotech.* 17, 37, 47.

Choice or identification of any reference in Section 2, or any section of this application shall not be construed as an admission that such reference is available or prior art to the present invention.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods for delivering one or more primary effector molecule(s) to a solid tumor. In one embodiment, the methods provide for delivery of a high level of one or more primary effector molecules. In particular, the invention provides methods by which a primary effector molecule(s), which may be toxic or induce adverse effects (e.g., increased immunological effects) when delivered systemically to a host, can be delivered locally to tumor by an attenuated non-replicated bacteria, such as deliverable with reduced virulence to the host. The present invention encompasses the preparation and the use of attenuated tumor-targeted bacteria, such as, e.g., *Salmonella*, as a vector for the delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s), to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria of this invention are facultative anaerobic or facultative aerobes which are engineered to express one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s).

The present invention provides engineered tumor-targeted bacteria engineered to express nucleic acid molecules encoding primary effector molecules at the site of a solid tumor. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a nucleic acid molecule encoding a primary effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. In accordance with this embodiment, a single bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecule(s) at the site of a solid tumor. In another embodiment, more than one attenuated tumor-targeted bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecule(s). In a mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains use of the same species. In another mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of different species (e.g., *Salmonella* and *Shigella*).

WB-011286/

PCV458012242

The primary effector molecules of the invention are useful for the treatment of a solid tumor cancer such as a carcinoma, sarcoma, lymphoma, or melanoma. As used herein, "treatment of a solid tumor" or "treat a solid tumor" encompasses inhibiting the growth of a tumor or tumor cells, reducing the volume of a tumor, slowing tumor cells, or spreading of tumor cells (metastasis). In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention induce a local immune response at the site of the tumor that results in the inhibition of growth of a tumor or tumor cells, the killing of tumor cells, or the prevention of the spread of tumor cells to other parts of the body. Accordingly, the primary effector molecule is provided a therapeutic effect for treatment of a tumor.

The primary effector molecules can be derived from any tumor organism, including, but not limited to, animals, plant, bacteria, fungi, and parasites, or viruses. In a preferred mode of use, the effector of the invention, the primary effector molecule is derived from a mammal. In a more preferred mode of use, the effector, the primary effector molecule is derived from a human. The primary effector molecule of the invention include members of the TNF family, anti-apoptotic factors, cytokines, 15 interleukins or lymphokines, tumor-inhibitory agents, and functional fragments thereof.

In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are members of the TNF family or functional fragments thereof. Examples of TNF family members, include, but are not limited to, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF-related 20 ectoderm-derived agonist (TREM), TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α (lymphotxin α), LT- β (lymphotxin β), OX40L (OX40 ligand), FasL, CD95L (CD95 ligand), CD30L (CD30 ligand), 4-1BBL, APRIL, or anti-apoptotic factors, FasL, DR5L, or 29 kDa type II transmembrane protein induced by interferon- γ (IFN- γ), TR1 to tumor necrosis factor-like cytokines, TNF- α , TNF- β , and APRIL-1 (ligand of the activation-inducible TNF receptor). In a preferred embodiment, a primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF-related ectoderm-derived ligand (TRAIL), TNF-related ectoderm-derived agonist (TREM), TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK), or a functional fragment 30 thereof.

In another specific embodiment, the primary effector molecule of the invention are anti-apoptotic factors or functional fragments thereof. Examples of anti-apoptotic factors, include, but are not limited to, caspases, angiotensin, angiotensin, anti-apoptotic antibodies (e.g., the 29 kDa TNF- α and a 49 kDa C-terminal epitope), fragments of 35 cytochrome c, a Bcl-2 family member, the Bcl-2 promoter, the Bcl-2 promoter, the 7.2 kb promoter, fragments of p53, Bcl-2, the anti-apoptotic 24 amino acid fragment of p53, Bcl-2, the anti-apoptotic factor designated 12.0, the anti-

[illegible]

4

4

1

2

(121)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Nucleoside

Nucleoside

solid tumor. In a number of the embodiments, the elements of tumor-targeted heteromultimers of the same species. In another embodiment, the elements of tumor-targeted heteromultimers of different species (e.g., *Adeno* and *Zebrafish*).

The secondary effector molecule(s) of the invention provide additional anti-tumor therapeutic activity, enhance delivery of the primary effector molecule(s) from the intracellular tumor-targeted bacteria, and/or enhance representation in the site of action, e.g., within the site of the tumor. The secondary effector molecule(s) of the invention comprises a molecule(s) (such as an anti-tumor protein, including but not limited to a cytotoxin, an enzyme and a bacteriophage) which is delivered in addition to the primary effector molecule(s) by the methods of the invention to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, sarcoma, lymphoma, or myeloma.

The secondary effector molecule(s) may be derived from any known organism, including, but not limited to, plants, plants, bacteria, fungi, and animals, or viruses. In certain embodiments, the secondary effector molecule(s) is derived from a bacteria or virus. In certain preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a bacterium (e.g., *EBV*). In certain preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a virus (e.g., *EBV*). In certain preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a mammal. In certain preferred embodiments, the secondary effector molecule(s) is derived from a human.

The invention provides a method of tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a plasmid or genetic vector. In a preferred embodiment of the invention, the tumor-targeted bacteria is a plasmid. When more than one effector molecule(s) (e.g., primary or secondary) is expressed in an annotated tumor-targeted bacteria, each is delivered, the effector molecule may be encoded by the same plasmid or genetic vector, or by more than one plasmid or genetic vector. The invention also provides a method of tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a genetic vector which is integrated into the bacterial genome. Integrated effector molecule(s) may be encoded by an annotated tumor-targeted bacteria (e.g., by *Salmonella*), or may be introduced into the annotated tumor-targeted bacteria (e.g., by introduction of a nucleic acid which encodes the effector molecule, such as a plasmid, transmissible vector, and, transposon, etc.) such that the nucleic acid encoding the effector molecule is integrated into the genome of the annotated tumor-targeted bacteria. The invention provides a nucleic acid molecule encoding an effector molecule which encodes a nucleic acid which is an appropriate promoter. A promoter operably linked to a nucleic acid encoding an effector molecule may be homologous (i.e., native) or heterologous (i.e., not native to the nucleic acid encoding the effector molecule).

- 14 -

ACKNOWLEDGMENTS

[illegible]

(124)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

5
 10
 15

(12) In addition, the released vesicle is associated with an increase of a release factor by the attenuated stress-regulated bacteria. In some embodiments, the release allows enhanced release of effector molecules from the cytoplasmic or periplasmic space. A release factor may be analogous to the attenuated stress-regulated bacteria or it may co-regulate (i.e., encoded by a vesicle and translocate that is not native to the attenuated stress-regulated bacteria). A release factor may be encoded by a vesicle and comprising a phorbol, or by a vesicle and which is integrated into the genome of the attenuated stress-regulated bacteria. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid and thus encoded a primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid and encoded a secondary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. In a preferred embodiment, the release factor is a *Thapsigargin Release Protein (TRP)*. In a specific embodiment, the TRP is that of the vesicle TRP1 plasmid, one of vesicle TRP2 plasmids, or the vesicle TRP3, TRP4 or TRP5 plasmids. In a preferred embodiment, the TRP is of vesicle TRP1 (TRP1 TRP). In another embodiment of the invention, the attenuated stress system comprises overexpression of a release factor.

20

The present invention also provides a method of a fusion protein of the invention in an attenuated stress-regulated bacteria, such as *Escherichia coli*, which bacteria have an attenuated stress system. In a preferred embodiment, the release factor is expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising a primary effector molecule fused to an Omp-like protein. In this embodiment, the co-expression of the release factor allows for enhanced release of the fusion protein from the periplasmic space.

25

In one embodiment, the present invention provides methods of delivering high levels of effector molecules to fusion proteins using artificial, attenuated stress-regulated strains of bacteria, which selectively increases when bacteria are subjected to the effector molecules or fusion proteins. In a specific embodiment, a modified, attenuated stress-regulated strain of bacteria selectively expresses effector molecules within bacteria. While the teachings of the following claims are discussed, for simplicity, with reference specifically to *Escherichia coli*, the compositions and methods of the invention are not so limited to be restricted to *Escherichia coli* but encompass any other bacteria to which the teachings apply. Specifically, the invention provides an attenuated stress-regulated bacteria which has a selective source or derivative source. Examples of attenuated stress-regulated bacteria include, but are not limited to, *Escherichia coli*, including non-recombinant *Escherichia coli*, *Shewanella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus* spp.

30

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated stress-regulated bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector

(125)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO/03/280

PCT/JP03/02421

antibodies. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and one or more targeted tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more acidic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and one or more bacteria engineered to contain one or more acidic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention. Further, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and one or more bacteria engineered to contain one or more acidic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules (i.e., primary effector molecules). In a preferred embodiment, the bacterial tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.

The pharmaceutical compositions of the invention are useful for the treatment of solid tumors. Solid tumor include, but are not limited to, sarcomas, carcinomas, lymphomas, and other solid tumor cancers, including, but not limited to prostate tumors, tumors of the central nervous system, brain cancer, prostate cancer, cervical cancer, uterine cancer, lung cancer, ovarian cancer, endometrial cancer, thyroid cancer, nasopharyngeal cancer, pancreatic cancer, stomach cancer, liver cancer, colon cancer, endometrial cancer, bladder cancer, and mesothelioma.

The present invention provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and more preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more acidic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and more preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more acidic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. The present invention also provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and more preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more acidic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention. Further, the present invention provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and more preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition

- 18 -

37

(127)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 02/2280

PCV028002284

Schweitzer are also necessary to know, for example, hydrolysis, a subgroup of Schweitzer monomers, commonly referred to as hydrolytic degradation.

- Analogy. As used herein, the term "analogy" refers to a polypeptide that possesses a similar or identical function as a primary or secondary effector molecule but does not necessarily comprise a similar or identical amino acid sequence of a primary or secondary effector molecule, or possess a similar or identical structure of a primary or secondary effector molecule. A polypeptide that has a similar amino acid sequence relative to a polypeptide that is a) at least one of the following: (b) a polypeptide having an amino acid sequence that is at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 100% identical to the amino acid sequence of a primary or secondary effector molecule described herein; (c) a polypeptide that is a) a polypeptide sequence that hydrolyzes to the amino acid sequence in a reaction sequence involving a primary or secondary effector molecule described herein; (d) at least 5 contiguous amino acid residues, at least 10 contiguous amino acid residues, at least 15 contiguous amino acid residues, at least 20 contiguous amino acid residues, at least 25 contiguous amino acid residues, at least 30 contiguous amino acid residues, at least 35 contiguous amino acid residues, at least 40 contiguous amino acid residues, at least 45 contiguous amino acid residues, at least 50 contiguous amino acid residues, at least 55 contiguous amino acid residues, at least 60 contiguous amino acid residues, at least 65 contiguous amino acid residues, at least 70 contiguous amino acid residues, at least 75 contiguous amino acid residues, at least 80 contiguous amino acid residues, at least 85 contiguous amino acid residues, at least 90 contiguous amino acid residues, at least 95 contiguous amino acid residues, or at least 100 contiguous amino acid residues; (e) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that is at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, or at least 100% identical to the nucleotide sequence encoding a primary or secondary effector molecule described herein. A polypeptide with similar structure to a primary or secondary effector molecule described herein refers to a polypeptide that has a similar secondary, tertiary or quaternary structure of primary or secondary effector molecule described herein. The structure of a polypeptide can be determined by methods known to those skilled in the art, including but not limited to, peptide sequencing, X-ray crystallography, Fourier transform mass spectrometry, circular dichroism, and CD spectroscopy.
- Anti-mitogenic factor. An anti-mitogenic factor is any polypeptide molecule which has anti-mitogenic activity, or a molecule that encodes such a polypeptide molecule. In a preferred embodiment, the anti-mitogenic factor is a peptide fragment or oligopeptide fragment of a larger protein.
- Anticancer. Anticancer is a sufficient so that a microorganism or vector is less pathogenic. The end result of infection is that the rate of toxicity as well as other deleterious effects is decreased, when the microorganism or vector is administered to the patient.

- 30 -

Organization

[illegible]

NOTES

Tumor-targeted. Tumor-targeted is defined as the ability to preferentially localize to a cancerous target cell or tissue relative to a non-cancerous counterpart cell or tissue as a replicate. Thus, a tumor-targeted host cell such as *Salmonella* preferentially attaches, infects and/or survives viable in the cancerous target cell or the tumor environment.

(130)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

NOTES

NOTES

Violence: Violence is a subject term describing the general ability to cause chaos, involving the ability to kill animal cells or the ability to split open stock (see specific definitions below).

An additional, the study designations V092059 (International Publication No. WO 99/1653), V09246 and 4.7 are used interchangeably and each refer to the strain deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession No. 202165. As used herein, the study designations V09246 and 4.7 are used interchangeably and each refer to the strain deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession No. 202164.

The present invention may be understood more fully by reference to the following detailed description, illustrative examples of specific embodiments and the appended figures.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1. Coding sequence for the mature domain TNF- α . Both DNA (SEQ ID NO:3) and protein (SEQ ID NO:4) sequences are indicated.

FIG. 2. Detection of the Salivary V092059 gpC-antibody.

FIG. 3. TNF- α , expressed from a ubiquitously transcribed promoter drives TNF- α gene in Salivary gland epithelium.

FIG. 4. Coding sequence for the synthetic OmpA signal sequence (nucleotides 1-60) fused to the mature human TNF- α (nucleotides 67-543). Both DNA (SEQ ID NO:5) and protein (SEQ ID NO:6) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 5. Replicative localization and processing of an OmpA/TNF- α fusion protein in B-cells (B4-10 cells).

FIG. 6. Coding sequence for the OmpA signal sequence (nucleotides 1-60) fused to the mature human TRAIL (nucleotides 67-885). Both DNA (SEQ ID NO:7) and protein (SEQ ID NO:8) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 7. Replicative and processing of an OmpA TRAIL fusion protein in B-cells (B4-10 cells).

CONTENTS

• 34 •

BY VATEMUR 124

parcours. The figure shows a graphic representation of mean tumor size over time of 6 mice per population with established CD4⁺ T-cells treated with (1) a PBS control; (2) and VNP2009 carrying an empty Y3334 vector; (3) and VNP2009 which expresses human thio-endonuclease; (4) and VNP2009 in which, expectedly, thio-endonuclease and RNP.

FIG. 15. Efficacy of VMP2000 over exporting capability on ELD1 against color cast classes. The figure shows a graph representing an increase in the value of the metric mean population with established ELD1 across tested with (1) a FBS network (2) and VMP2000 carrying on empty YAS134 region and (3) VMP2000 which on porous luciferase-inducible and RFP.

FIG. 19. Anti-glioblastoma activity of lysates from attenuated tumor-injected *Salmonella* expressing human osteocalcin on metastatic cells. This figure shows the inhibition of human glioblastoma cells (MG-132) proliferation in response to iHGF and lysates corresponding to 8×10^4 bacteria. As a control *Salmonella* secreting the empty pGK vector was used. Each dot, point is a mean of quadruplicate values from a representative experiment. Samples were assayed by the number of bacteria.

FIG. 20. Anti-polliniferous activity of *hymen* from attenuated *unio*-tagged *Salmonella* expressing *unio*in *hymen* (positive control) (76-79 of phage titer) and *chicken* (negative control) (1.43) on *unio*infected cells. This figure shows the interaction of *hymen* (in *unio*infected cells) (HUVIC) with *hymen* in response to BGP and *hymen* (comprising 3.0 $\times 10^5$ bacteria). As a control *Salmonella* expressing the empty pTV vector was used. Each data point is a mean of quadruplicate values from a representative experiment. Statistics was calculated by the number of bacteria.

50C.21. Construction of the pZL shuttle vector

FIG. 2. Construction of the ColE3-C438 Vector (GenBank Accession Number AF192770). The restriction sequence of the ColE3-C438 Vector is as depicted in SEQ ID NO: 1. The ColE3-C438 Vector contains 3 open reading frames as depicted in SEQ ID NO: 2-4, respectively.

(133)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

- FIG. 23. Construction of the Cyt ES-CAR987-1 vector.
- FIG. 24. Bar Graph showing the amount of fetal cells of cytot ES preferentially made with.
- FIG. 25. (Rho assay) the various strains exposed to ultraviolet light or 5-cys.
- FIG. 26. Efficacy of 41.2.9Cyt ES on C18 murine melan carcinoma.
- FIG. 27. Anti tumor activity of 41.2.9Cyt ES on DLD-1 human colon carcinoma in 20/100 site.
- FIG. 28. Efficacy of 41.2.9Cyt ES on B16 melanoma melanoma.
- FIG. 29. Cytotoxicity of Salivamide targeting chond E. and C18F.
- FIG. 30. Fetal cells exposed to C18F (A) show submergence and malformation relative to normal fetal cells (B).
- FIG. 31. The nucleotide profile of the pCVD442-oriB vector in the 3' as 5' orientation (as viewed) is as FIG. 32 map, with a deletion in the middle of oriB and containing internal NotI, PstI, SphI, BstI, SmaI and ClaI polylinker in its place (FIG. 33) (FIG. 33). See FIG. 32.
- FIG. 32. Restriction map and schematic of the pCVD442-oriB vector for cloning DNA in the OriB region and subsequent insertion on the chromosome. oriB, PstI, the 3' and 5' regions of OriB and each 20K, the subcloning element in order for the plasmid to be transcribed from one strand to another. Also, the beta-lactamase gene which confers resistance to tetracycline antibiotic, confers tetracycline resistance. Each, the gene which confers resistance to tetracycline.
- FIG. 33. 1) pCVD442-TetRFP-AD vector, 2) homologous recombination with the tetracycline resistance gene in Salivamide Y250102, 3) chloramphenicol tetracycline in Salivamide Y250102, and 4) following plasmid transfection to strain VNP20060, 5) increase restriction cloning in strain 41.2.9-TetRFP-AD. oriB, the plasmid origin of replication, oriB, the subcloning element in order for the plasmid to be transcribed from one strand to another. Also, the beta-lactamase gene which confers resistance to tetracycline.

(134)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

5/10/2007

PCT/JP2004/02421

lymphocytes such as T-lymphocytes and B-lymphocytes, the gene which confers sensitivity is activated. Note: not drawn to scale.

FIG. 34. Percent transfection of HEP2 cells with and without 72 hours of exposure to positive and negative controls (GFP and H1) following 72 hours of exposure to HEP2 cells (see Note 1). Expression of luciferase was induced by transfection of cells with 72 and 74. Transfection treatment (+) and no transfection treatment (-) The R cell results HEP2 were used as a positive control for percent transfection.

FIG. 35. Halo formation on blood agar for streptococci strains (G1) and (G2) in the absence of streptococci (HA) and the presence of streptococci (HB). Halo formation for streptococci strains (G1) and (G2) was observed in streptococci exposed to HA, in the absence of streptococci (HA) and the presence of streptococci (HB). Halo formation for streptococci strains (G1) and (G2) was observed in streptococci exposed to HA, in the absence of streptococci (HA) and the presence of streptococci (HB).

FIG. 36. (A) An illustration of the TAT-aptamer fusion protein without the luciferase tag. (B) An illustration of the TAT-aptamer fusion protein with the luciferase tag. (C) An illustration of the TAT-aptamer fusion protein with an OmpA-like signal sequence.

FIG. 37. Coding sequence for TAT-aptamer fusion protein. Both DNA (6042) and protein (6042) sequences are indicated.

FIG. 38. Coding sequence for luciferase-TAT-aptamer fusion protein. Both DNA (6042) and protein (6042) sequences are indicated.

FIG. 39. Efficacy of VMP2009/10/11/12/13 combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

FIG. 40. Efficacy of VMP2009/10/11/12/13 combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

FIG. 41. Efficacy of VMP2009/10/11/12/13 combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

CONCLUSIONS

3

1

3

2

1

(136)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

1/10 04/27/07

ECT/06/06/06/06/06

bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a target peptide, a proteolytic cleavage site, a heavy peptide tag as effector molecule. Activated engineered bacteria are engineered to express one or more fusion proteins of the invention and use a more efficient substrate of the invention.

- 17 The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an activated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an activated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. Further, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an activated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins and one or more effector molecules.

- 18 The present invention provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal an agent derived from an activated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal a agent derived from an activated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. Further, the present invention provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal a agent derived from an activated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins and one or more effector molecules. The method, the animal is a mammal (e.g., a dog, a cat, a horse, a cow, a monkey, or a pig) and may preferably be a human. Examples of solid tumor cancers in which, but are not limited to, melanoma, sarcoma, lymphoma, and other solid tumor cancers, including but not limited to, breast cancer, prostate cancer, cervical cancer, gastric cancer, lung cancer, ovarian cancer, endometrial cancer, thyroid cancer, pancreatic cancer, pancreatic cancer, colon cancer, liver cancer, colorectal cancer, esophageal cancer, stomach cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, bladder cancer, and mesothelioma.

- 20 Although not intended to be limited in any way, the invention believes that the present invention provides in the targeted expression of the effector molecule(s) at the site of a tumor by delivery of the activated tumor-targeted bacteria vector containing the effector molecule(s).

- 21 Although not intended to be limited in any way, the invention believes that the present invention provides in the targeted expression of the effector molecule(s) at the site of a tumor by delivery of the activated tumor-targeted bacteria vector containing the effector molecule(s).

Self-identified:

CONTENTS

For reasons of clarity, the detailed description is divided into the following sections: Banned Vehicles; Primary Effector Molecules for Toxic Therapy; Secondary Effector Molecules for Coagulation With Primary Effector Molecules; Dendrimers and Analogous Polymers; Encapsulated Vehicles; and Methods and Compositions for Delivery.

5.1. BACTERIAL VECTORS

Any attenuated toxin-tagged bacteria may be used in the methods of the invention. More specifically, the attenuated nontoxigenic bacteria used in the methods of the invention are facultative anaerobes or facultative aerobes. Examples of attenuated toxin-tagged bacteria that are facultative anaerobes or facultative aerobes which may be used in the methods of the invention include, but are not limited to, *Escherichia coli* (including enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Adjuvax*, *Adjuvax* *hominis*, and *Shigatoxin* *col* spp.

Factors influencing the effectiveness and target-specificity are described herein and may be used to construct or select an appropriate (a) target strain for use in the methods of the invention. For example, methods to select and isolate target-targeted bacteria are described in Sections 4.1, and methods to attenuate bacteria are described in Section 6.2 of International Publication No. WO/99/02325, which are incorporated herein by reference.

20 Examples of extended family-included are also described in *Intergenerational Applications* WY0001053, which is incorporated herein by reference in its entirety. In certain embodiments of the invention, a bacteria may be modified by methods known in the art to be attenuated or highly attenuated.

The present invention provides means for awarding benefits as a reward for the delivery of one or more primary objective outcomes (e.g., a 1794 family member, a company payable or a policyholder, a donor satisfying criteria, or an agent-employee) whose state or its combination with one or more secondary objective measures (e.g., the grantee's investment risk profile addressed means beyond benefits as a vector for the delivery of one or more focus policies of the investment state or in combination with one or more objective outcomes). In a preferred embodiment of the invention, the awarded monetary benefits include what is considered to represent an average or average rate of return (e.g., a rate of return calculated on the basis of the investment state's performance).

While the inheritance of the following features makes species-specific to *Salmoneid*, the compositions and structure of the insecticide, is the only criterion to be considered in *Salmoneid* but excludes any other features to which the taxonomic apply. Suitable bacterial species include, but are not limited to, *Enterobacter* spp. including enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Salmoneid* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria*

© 2004 Blackwell Publishing Ltd

5.1.3 SALERVILLE VICTIMS

Despite such an *S. dubauti* in a concrete space of disease in humans and animals. One such disease can be caused by *S. dubauti* is *scabies*, which is a serious problem because of the high mortality rate associated with the onset of severe shock (Bloom, 1958; Clinical Microbiol. Rev. 6:57-68). Therefore, to allow the safe use of *S. dubauti* vectors in the present preparation, the bacterial vectors such as *S. dubauti* are shown to their relevance for the existing disease. In the present application, *scabies*, in addition to the traditional disease in which a noncommensal vector is modified so that the macrophage vector is less pathogenic, is selected to illustrate also the modification of a

25 mutations can be achieved by the deletion or disruption of *DNA* regions in which recombination occurs that insure survival of the bacteria in the host cell, especially transposons and integrons. Each deletion or disruption mechanism is well known in the art and includes, for example, homologous recombination, site-specific recombination, random mutagenesis, or targeted mutagenesis. Those techniques which are associated with survival in transposons are usually mentioned in the foregoing text.

multicellular organisms in response to stress signals, for example, acidification, or in response to host cell defensive mechanisms such as macrophagocytosis (Fishis et al., 1986; Nov. *Mol. Biol. Sci.* 11:8A-82-818-5159). Table 4 of International Publication NO 86/00258 is an illustrative list of *Salmonella* virulence factors whose deletion results in attenuation.

Yet another excited for the attenuation of the bacterial vectors, such as *Shigella* 25 is to modify epitopes of the bacteria which are responsible for the virulence of these bacteria. For example, *Escherichia coli* (EPEC) or *Salmonella* is primarily responsible for

(139)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

the pathological effects of bacterial agents. The compound of LPS with lactate is the response to LPS A ("LA"). Elimination or mitigation of the toxic effects of LPS results in an increased bacterial state. The risk of acute shock in the patient is reduced and 2) higher levels of the bacterial state can be tolerated.

Altering the LA content of bacteria, such as *Salmonella*, can be achieved by the introduction of mutations in the LPS biosynthesis pathway. Several enzymatic steps in LPS biosynthesis and the genetic tool controlling them in *Salmonella* have been identified (Ratner, 1995, J. Bacteriol. 175:5745-5753) and enzymes involved, as well as corresponding mutants. One such alternative mutant is *flaA*, a mutation within the gene that codes for enzyme UDP-NAC(6S)-3-O-phospho-6-phospho-2-deoxyhexose 4-epimerase, which 16 regulates the third step in *Salmonella* biosynthesis (Kolby et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:19665-19671). *Salmonella* strains lacking this step of biosynthesis produce a LPS that differs from wild-type LPS in that it contains a novel fatty acid, a hexadecanoic acid (Hay and Cohen, 1994, J. Bacteriol. 176:6539-6546). Hay and Cohen demonstrated that in addition to blocking the third step in biosynthesis biosynthesis, the *flaA* mutation also 15 decreases enzymatic activity of *flaA* A, which regulates the third step of LPS biosynthesis.

In addition to being attenuated, the bacterial vectors of the invention are tumor-targeted, i.e. the bacteria preferentially attach to, infect, and/or colonize viable or cancer or tumor cell surface or internal sites, non-tumor or non-target cell. Suitable methods for obtaining attenuated tumor-targeted bacteria are described in Section 6.1 (pages 25-32), tumor-targeting and Section 6.2.2 (pages 43-51) (attenuation) of International Publication WO 94/0233, which are incorporated herein by reference. As the resulting vectors are highly specific and super-infective, the efficiency increases the number of infecting bacteria 20 found in the target tumor or tumor cells compared to the non-super-infective parental bacteria (larger than larger as the diameter of the super-infective culture is increased such that fewer than 1000 super-infective vectors can be used with positive results. The techniques described in International Publication WO 94/0233 can also be used to produce attenuated tumor-targeted *Salmonella* or non-*Salmonella* bacterial vectors.

As illustrative examples of an attenuated tumor-targeted bacterium having an LPS pathway mutant in the wild-type *Salmonella* vector described in International Publication WO 99/01993, which is incorporated herein by reference in its entirety, one specifically 25 instance is a *flaA* 2 which describes the characteristics of the *flaA* 2 *Salmonella* mutant. One characteristic of the mutant *flaA* 2 is its decreased ability to induce a TNF- α response compared to the wild-type bacterial vector. The mutant *Salmonella* induce TNF- α expression at levels of about 5 percent to about 49 percent compared to the levels induced by wild-type *Salmonella*.

CONTENTS

5

2

5

20

1

(141)

JP 2004-505042 A 2004.1.8

WO 2004/02300

ECLA: B6000000

more effector molecules to a solid-phase carrier. In preferred embodiments, the attenuated trans-activated bacteria are constructed to express one or more of the proteins and optionally, one or more effector molecules.

5.3. PRIMARY EFFECTOR MOLECULES FOR TUBERCULOSIS

The invention provides for delivery of primary (and optionally secondary) effector molecules (e.g., by attenuated trans-activated bacteria, such as *Mycobacterium*). The effector molecules of the invention are polypeptide molecules, (e.g., proteins (including but not limited to peptides, polypeptides, proteins, post-translationally modified proteins, etc.). The invention further provides methods to identify molecules which encode the primary effector molecules of the invention.

The primary effector molecules can be derived from any known organism, including, but not limited to, animals, plants, bacteria, fungi, and protozoa or viruses. In a preferred embodiment of the invention, the primary effector molecule(s) is derived from a mammal. In a more preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is derived from a human. The primary effector molecules of the invention comprise members of the TNF family, interleukin-6 family, cytokine, polypeptides or peptides, tumor inhibitory compounds, and chemokine cytokines thereof.

In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are members of the TNF family or functional fragments thereof. Examples of TNF family members, proteins, that are not limited to, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWSAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, VISTA, TNFSF14, TNFSF17, and MYD88. In a preferred embodiment, a primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF-related weak inducer of apoptosis (TWSAK), and CD40 ligand (CD40L), or a functional fragment thereof. For review see, e.g., Kovac, B. et al., 1999, Curr. Opin. Immunol., 11:340-345, which describes members of the TNF family. Also, Table 1 herein below, lists chemokine and associated receptors of accessory members of the TNF family. In a preferred embodiment of the invention the primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF-related weak inducer of apoptosis (TWSAK), or CD40 ligand (CD40L).

PCVAC5000-123267

[illegible]

PCT/US99/012472

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/17/2007

(144)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

FIG. 10 (continued)

FIG. 10 (continued)

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the C-terminus 29 kDa proteolytic fragment of Osteonectin. The expression vector for this fragment can be generated by standard methods using the full length nucleic acid sequence encoding the Osteonectin precursor protein (Genbank Accession No. M59745), and a description of the structure of the expected protein. In a preferred embodiment the C-terminus 29 kDa fragment of Osteonectin is expressed as a cytoplasmic protein under the control of the *lac* promoter, for example by insertion into the pET28a plasmid.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a myxoma phosphoglycerate kinase (pGK) enzyme fragment. In one mode of the embodiment, the fragment is a dominant negative mutant of pGK (see, e.g., Crowley et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5401-5405). In another mode of the embodiment, the fragment is a protein antagonist of a protein kinase termed (Gardner et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11818-11823). In yet another mode of the embodiment, the fragment is a dominant negative soluble sRNA receptor (Jin et al., 1996, Cancer Res. 56:2479-2483).

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 163 kDa N-terminal fragment of plectin, comprising approximately 120 amino acids, or a biologically active fragment thereof (see coding sequence for plectin-163 in Genbank Accession No. U041004). In a specific embodiment, and plectin-163 fragment has a Cys207-Ser205 mutation to circumvent autoinhibited cross-linking of two proteins by disulfide bonds.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 7.2 kDa plectin domain-4 fragment. In a specific embodiment, the 7.2 kDa plectin domain-4 fragment is expressed as a fusion protein wherein the amino terminal comprises the Ser23 residue and the C-terminus comprises the Ser23 residue. In another embodiment, the specific binding domain of plectin domain-4 are fused to glutamate esterase, which results in a fusion protein having potent anti-angiogenic activity (Mikami et al., 1991, Cancer Res. 51:2077-2083). The coding sequence for plectin domain-4 in the Genbank Accession No. M84106019.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a small peptide corresponding to the anti-angiogenic 83 amino acid fragment of plectin domain-4, the anti-angiogenic factor designated 75.69, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin 1, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SP-ARC, the small anti-angiogenic peptide of 19 amino acids, plectin-163, or BGP, or small peptide sequences of 19 amino acids, or the VEGFR-1 receptor. In a specific embodiment, the small peptides are expressed by insertion into a secretory protein polypeptide. The expression of the small peptides are provided by CDS (1956, Encp.

-37-

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/17/2007

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/17/2007

ACKNOWLEDGMENTS

10 Accordingly, a primary effluent effluent may comprise any known or described bacteria or known in the art, with the proviso that said bacteria is not a bacteroid released therein.

The primary effector molecules of the invention are useful, for example, to treat, or prevent a viral tumor lesion such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma.

The nucleic acid molecule encoding a primary receptor molecule is from about 6 to about 100,000 base pairs in length. Preferably, the nucleic acid is from about 20 base pairs to about 30,000 base pairs in length. More preferably, the nucleic acid molecule is from about 20 base pairs to about 10,000 base pairs in length. Even more preferably, the nucleic acid molecule is about 20 base pairs about 4000 base pairs in length.

15 In certain erobodioxoses of the lavesion, the primary effector molecule (e.g. a TGF β family member, a cytokine, a growth factor, an anti-apoptotic factor, or a tumor

(148)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 2002/01777
 inhibitory enzyme) is suitably incorporated in a bacterial vector with greater complexity,
 i.e., secondary effector molecule. The secondary effector molecule provides additional
 therapeutic value and/or facilitates the release of the enzyme of the nucleic acid viral
 vector (which expresses at least one primary effector molecule and optionally one or more
 secondary effector molecule) into the mammalian compartment. As such herein, the term
 "additional therapeutic value" indicates that the secondary effector molecule provides an
 additional therapeutic, cytotoxic, or cytostatic effect on a tumor, e.g., in addition to that
 provided by the primary effector molecule(s). Thus, a secondary effector molecule
 functions as an additional therapeutic factor under a related tumor. Furthermore, the
 secondary effector molecule, whether a therapeutic or release factor (or both), is
 preferentially or specifically activated or enhanced in the diseased site, i.e., in the site of the
 tumor. In certain embodiments, the secondary effector molecule can serve two functions,
 i.e., promote the release of the nucleic acid molecule (e.g., by promoting bacterial cell lysis
 or host cell lysis) and provide therapeutic value (e.g., by cytotoxicity to the tumor cells). In
 certain non-limiting embodiments, the cytotoxicity of the secondary effector molecule can
 be mediated by the patient's immune system according to which a secondary effector
 molecule can function as an immunomodulator.
 In certain embodiments of the invention, the measured tumor-targeted bacterial
 vector of the invention is engineered to express at least one secondary effector molecule
 which has anti-tumor activity, i.e., expression of the secondary effector molecule results in
 killing or inhibition of the growth of a tumor or tumor cells.
 The secondary effector molecule is penicillamine or a nucleic acid molecule. The
 nucleic acid molecule can be double stranded or single stranded DNA or double stranded
 or single stranded RNA, as well as oligo, nucleic acid nucleotides. The nucleic acid
 molecule can function as a ribozyme, or nucleic acid nucleotide, thereby presenting
 nucleic acid nucleotides as oligonucleotides that bind to a nucleic acid target sequence
 to nucleic acid, such as mRNA or DNA. When bound to a RNA, the nucleic acid molecule
 sequence, which presents inhibition of the mRNA (for e.g., U.S. Patent Nos.
 5,195,015; 5,195,016; 5,195,017 and 5,195,018). The nucleic acid molecule can be single DNA
 strand that bind duplex DNA, forming a nucleic acid complex, thereby presenting
 nucleic acid nucleotides (for e.g., U.S. Patent Nos. 5,195,015; 5,195,016; 5,195,017 and 5,195,018).
 A ribozyme is an RNA molecule that specifically cleaves RNA substrates, such as
 mRNA, resulting in inhibition or interference with cell growth or expression. These are at
 least two known classes of ribozymes identified in the cleavage and the cleavage of RNA
 substrates. Ribozymes can be targeted to any RNA substrate and can catalytically cleave the
 substrate (for e.g., U.S. Patent Nos. 5,272,263; U.S. Patent Nos. 5,149,019; and U.S. Patent
 Nos. 5,149,020; 5,149,021; 5,149,022 and 5,149,023).

- 31 -

(149)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

FIG. 10A-10C

FIG. 10A-10C

As described above for the primary effector molecule, a suitable solid support is comprising a secondary effector molecule is provided to operative linkage with a cellular precursor, and optionally to operative linkage with other elements that participate in transcription, translation, transcription, and/or other cellular processes. Further, the secondary effector molecule can be expressed using the same promoter as the primary effector molecule and an internal ribosome binding site, or using a different promoter than the primary effector molecule.

The suitable solid molecule containing the secondary effector molecule is from about 100 to about 100,000 base pairs in length. Preferably the suitable solid molecule is from about 20 to about 100,000 base pairs in length. More preferably the suitable solid molecule is from about 20 to about 100,000 base pairs in length. Even more preferably, it is a suitable solid molecule from about 30 to about 4,000 base pairs in length.

The suitable sequence of the effector molecule is encoding the secondary effector molecule described below are well known (see OneBank). A suitable solid molecule is encoding a secondary effector molecule, which secondary effector molecule is a cytosolic or extracellular protein or a biologically active fragment, which is detectable, may be used by a suitable method, such as antibodies (e.g., PCR), protein detection of sequence or DNA library, antibody screening of expression libraries, etc. which is identified or obtained from commercial or other sources.

Under suitable conditions and oligonucleotides for use as described herein can be synthesized by any method known in the art (see, e.g., International Publication WO 93/02101, U.S. Patent Nos. 5,215,000; 5,175,267; and 5,169,120). Identification of oligonucleotides and their use for the use as set forth herein involve methods well known in the art.

5.3.3. FACTORS PROVIDING ADDITIONAL THERAPEUTIC VALUE

In certain embodiments of the invention, the successful trans-acting histone factor of the invention, which expresses at least one primary effector molecule and is preferably a deliverable vector, comprises at least one secondary effector molecule which is a suitable vector, i.e., expression of the secondary effector molecule results in killing or inhibition of the growth of a tumor or tumor cells or growth of tumor cells, thereby augmenting the cytotoxic or cytostatic action of the primary effector molecule. In one embodiment, the effect on the tumor of the secondary effector molecule is additive to that of the primary effector molecule. In a preferred embodiment, the effect is synergistic or synergistic, i.e., greater than the sum of the effects of the primary and secondary effector molecules if administered separately.

•42•

(150)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 98/0293

CYCLOOXYGENASE

In another embodiment, the secondary effector molecule is a cyclin or a cyclin-like protein that inhibits cell growth through interference with protein synthesis or through disruption of the cell cycle. Such a protein may act, for example, by elevating cdk2 or cyclin-dependent kinase, inhibiting an oncogene factor, or acting on DNA, or other mechanisms that reduce protein synthesis to a level similar to the cell arrest control. Examples of such secondary effector molecules include but are not limited to rapamycin, the retinoids, thapsigargin, and other inhibitors of protein synthesis (COP).

In another embodiment, the secondary effector molecule is a pro-drug converting enzyme or a factor that encodes the same, i.e. an enzyme that mediates the chemical action of a drug to produce a cytotoxic agent. Hypothetical examples of pro-drug converting enzymes are listed on page 35 and in Table 2 of WO 98/0293 by Pissick et al., which is incorporated herein by reference. WO 98/0293 also describes methods for production of secreted fusion proteins containing such pro-drug converting enzymes. According to the present invention, a pro-drug converting enzyme need not be a secreted protein of a cell-expressed with a release factor such as IIRP (see, *infra*, Section 5.2.2). In a specific embodiment, the pro-drug converting enzyme is cytosolic p49 MAD2H endonuclease which acts upon mitomycin C to produce mitomycin (Murray et al., 1994, J. Pharmacol. Exp. Therap., 270:645-649). In another embodiment, the secondary effector molecule is co-expressed with a release factor such as IIRP, and causes the release of a cytotoxic agent, e.g., MAD2H, MAD2H, ATP, etc.) which activates pro-drug converting enzyme activity. In another embodiment of the invention, a secondary effector molecule is co-expressed with a release factor such as IIRP. Having to the release of an activated drug (e.g., a drug which is released within the tumor cell cytoplasm or nucleus, and then released from the tumor cell nucleus).

In another embodiment, a secondary effector molecule is an inhibitor of tubulin or tubulin-like protein (NOD) or of cholesterol side chain synthesis. NODs (side chain) is implicated to be involved in the regulation of cellular growth and in tumorigenesis. NOD is found in the cytoplasm by which on the cytoskeleton (NOD) and protein synthesis, and secondary effector molecule.

In another embodiment, the secondary effector molecule is a cyclin or a cyclin-like protein that inhibits cell growth through interference with protein synthesis or through disruption of the cell cycle. Such a protein may act, for example, by elevating cdk2 or cyclin-dependent kinase, inhibiting an oncogene factor, or acting on DNA, or other mechanisms that reduce protein synthesis to a level similar to the cell arrest control. Examples of such secondary effector molecules include but are not limited to rapamycin, the retinoids, thapsigargin, and other inhibitors of protein synthesis (COP).

In another embodiment, a secondary effector molecule is a cyclin, chemokine, or an immunomodulatory protein or a molecule that encodes the same, such as interferon- γ .

In exactly other analogies to the literature, the associated interest-targeted
bilateral vector of the innovation, which originates at least one primary interest molecule
and is probably a Scholowski vector, originates at least one secondary effect molecule
which functions to preserve the historical and contemporary or to reinforce the relevance
of intercellular consequences like the extracellular environment, e.g., in the human skin, thereby
enhancing the delivery of the primary and/or secondary effect of molecule(s). Such
secondary effects to include what permeates like the bacterial cell or molecules release
is referred to as "release factor". To ensure outperforming, the release factor also
physiologically has heat-shock activity.

Abstract

80

43

24

22

3

24

(153)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O content
 previously more than 70%, even preferably 80%, and even preferably more than 80% and
 more preferably 90-100% of lesions.

In a specific embodiment of the invention, the BRP protein is a pCDP13 BRP⁺
 variant whose titer function has been adapted from its parent robust function, thereby
 enhancing protein release without loss of its genetic stability. In a specific embodiment, the
 titer function is a pCDP13 BRP⁺ variant. This embodiment allows for prolonged protein release from the
 bacterial vector, while maintaining the high efficiency of the vector. In
 another specific embodiment, the BRP of the invention is a pCDP13 BRP⁺ with a
 robust C-terminal, which in addition to protein release allows for high (Chen et al.,
 1998, J. Biotechnol. 171:2573-2579).

In another embodiment of the invention, the robust release protein is a
 consequence of a particular use, e.g., Bagworth, S. and Williams, N., 1992, J. Biol.
 Chem. 267:1607-11.

In certain embodiments where a BRP is expressed by the bacterial vector of the
 invention, the BRP may be expressed in the cytoplasm of a recombinant microorganism
 or it may be expressed (e.g., encoded by a vector) in a cell that is not active for the
 recombinant protein. A BRP may be encoded by a vector that is not active for the
 recombinant protein, or by a vector that is integrated into the genome of the recombinant
 bacterium. A BRP may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a
 primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A BRP may be
 encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a secondary effector molecule,
 or by a separate nucleic acid or plasmid. In one embodiment, the BRP-like protein is
 expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising an effector molecule
 fused to an OmpA-like protein. In this embodiment, the co-expression of the BRP allows for
 enhanced release of the fusion protein.

In a preferred specific embodiment of the invention, a BRP encoding nucleic acid is
 encoded by a nucleic acid. In another specific embodiment of the invention, the BRP
 encoding nucleic acid is integrated into the genome of the recombinant bacterium, which is
 an OmpA-like protein that is fused to a protein (e.g., a protein that binds to a cell wall or
 to a cell surface). In a preferred embodiment, the BRP encoding nucleic acid is expressed
 under the control of the pCDP13 promoter, which is activated in response to the metabolic
 state of the host environment (see e.g., Lohmeyer et al., 1997, J. Biotechnol. 179:1505-
 1517).

Alternatively, the protein can be an endotoxin-induced protein, such as the
 protein of the Tn10 transposon. In a preferred embodiment, the protein is a
 protein, which is released from a cell in a controlled manner in the presence of
 an inducer or a signal, such as a signal molecule and a signal molecule and provides a

- 60 -

Author disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

5.4. DERIVATIVES AND ANALOGS

13 The invention for their comprehensive beneficial use can be modified so as to be
delivered a derivative, including but not limited to a fragment, residue, or variant of a polypeptide
and/or secondary effect molecule, or a mixture including the same. The derivative,
10 such as variant is functionally active, e.g., capable of exhibiting one or more functional
activities associated with a full-length, wild-type or other molecule. As one example, such
derivatives, analogs or variants which have the desired biological properties can be used
to identify agents or to the extent of better cells (mutants). Derivatives or analogs of
15 effect molecule can be tested for the desired activity by procedures known in the art,
including those described herein.

In particular, vaccines can be made by attaching a foreign nucleic acid encoding sequences by substitution, addition (e.g., insertions) or deletions that provide a method to having the minor or increased anti-heparan response relative to the wild-type of the host organism. For example, the variants of the heparinase genes, that are not limited to, those containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of an effector molecule, including, altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for the residues within the sequence required for a critical change, i.e., at all critical residues but at least one conservative substitution.

Any of the primary or secondary effluent-producing animals which is one of numerous in origin can be exposed to multiple hormonal action via; by methods known to the art. Preferred carbon usage is exemplified in Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. New York, and Sheng et al., 1991, (Cm 108-6)-72.

Two cases

PCR conditions

In a specific embodiment, a derivative, coding or reverse of a primary or secondary sequence comprises a nucleotide sequence (including) related to the sequence sequence encoding the primary or secondary sequence, or fragment thereof, or a fragment thereof (e.g., hybridization to filter-bound DNA, in the case of hybridization to DNA (SSC) at about 45 °C followed by one or more washes in 0.2xSSC/0.1% SDS at about 40-60 °C, under highly stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound nucleic acid in 6xSSC at about 45 °C, followed by one or more washes in 0.1xSSC/0.2% SDS at about 45 °C, or under other stringent hybridization conditions which are known to those of skill in the art (see, for example, Sambrook, F.M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.18.3).

Derivative or analog of a primary or secondary sequence molecule nucleic acid are not limited to those molecules comprising sequences that are substantially homologous to the primary or secondary sequence molecule or fragment thereof (e.g., in various embodiments, at least 65% or 75% or 80% or 90% or 95% identity over an entire acid sequence of identical size without any deletions or additions or where compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer knowledge program known to the art) or where encoding nucleic acid is capable of hybridizing to a complementary nucleic acid sequence under high stringency, moderate stringency, or low stringency conditions.

To determine the percent identity of two nucleic acid sequences or of two amino acid sequences, e.g., between the sequence of a primary sequence molecule and the "query" sequence, the sequences are aligned by the optimal comparison procedure (e.g., gaps can be introduced in the sequence of a first nucleic acid or protein to maximize the optimal alignment with a second nucleic acid or protein sequence). The amino acid positions or nucleotide positions at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (i.e., % identity = # of identical positions/total # of positions (e.g., overlapping positions) x 100). In one embodiment, the two sequences are the same length.

The determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. A well-known, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of two sequences is the algorithm of Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3673-3677. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul, et al., 1990, J. Mol.

• 48 •

A primary effector molecule or a secondary effector molecule, or derivative, or analog thereof can be produced by various methods known in the art. The compounds which result in their production can come at the expense of or protein loss. For example, a cloned effector molecule encoding a specific enzyme. For example, an effector molecule can be modified by any of numerous means known in the art (Sambrook et al., 1989; *Molecular Cloning*, J. Sambrook, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory

DECLARATION OF INTEREST

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/ticontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/17/2007

(158)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

(b) *in vitro* activity. The invention provides methods with encoding genes, nucleic acids, or other materials of this invention, also provide said encoding a fusion protein of the invention is typically related to an appropriate promoter.

In a specific embodiment, an effector molecule is constructed as a chimeric or fusion protein comprising an effector molecule or fragment thereof (preferably consisting of at least a domain or most of the effector molecule, or at least 5, at least 10, at least 25, at least 50, at least 75, or at least 100 amino acids of the effector molecule) joined to its amino or carboxy-terminus via a peptide bond to at least one residue of a different protein. In specific embodiments, fusion constructs at least 2, at least 4, at least 10, at least 20, at least 50, at least 75, or at least 100 contiguous amino acids of the heterologous polypeptide or fragment thereof that is functionally active. In any embodiment, such a fusion protein or chimeric protein is produced by recombinant expression of a nucleic acid according to the primary effector molecule (e.g., a TCR-coding sequence, or a nucleic acid encoding sequence, a secretory inhibitory expression-coding sequence, or a cytosolic polypeptide-coding sequence) joined in-frame to a coding sequence of a different protein. Such a chimeric construct can be made by ligating first appropriate nucleic acid sequences encoding the desired amino acid sequences to each other by methods known in the art, in the proper coding frame, and expressing the chimeric product into a cell expressing a suitable set of genes by methods commonly known in the art. Chimeric nucleic acids can joining sections of a nucleic acid encoding an effector molecule fused to any heterologous polypeptide-coding sequence may be constructed. A specific embodiment relates to a chimeric protein comprising a fragment of a primary or secondary effector molecule of at least 5, at least 10, at least 25, at least 50, or at least 100 amino acids, or a fragment that displays one or more structural properties of the full-length polypeptide or secondary effector molecule.

In a specific embodiment, a fusion protein comprises an effector tag, such as a biotinylated tag, or other affinity tag that may be used for purification, isolation, identification, or assay of expression. In another specific embodiment, a fusion protein comprises a protein cleavage site such as a protease or matrix cleavage site. In this embodiment, it is to be noted that preferred that a protein site corresponding to a sequence which is active at the site of a target is constructed into a fusion protein of the invention. In certain embodiments, an effector molecule is constructed as a fusion protein to one or more of the protein, or fragments thereof (e.g., signal sequence, intracellular region, extracellular region, transmembrane domain, extracellular domain, or extracellular domain), or fragments thereof (e.g., signal sequence, intracellular region, extracellular region, transmembrane domain, extracellular domain, or extracellular domain).

In a preferred embodiment, an effector molecule (effector or secondary) of the invention is expressed as a fusion protein with an enterotoxin protein (e.g., enterotoxin protein). Such a fusion protein provides an antigenic molecule provided of the

+ 53 +

(159)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

10 bacterial outer membranes, possess multiple membrane-spanning domains and are often
 attached to one or more lipid vesicles. Outer membrane proteins are initially expressed in
 precursor form (the pre-OmpA) with an amino terminal signal peptide that directs the protein
 to the membrane, upon which the signal peptide is cleaved by a signal peptidase to produce
 the mature protein. In one embodiment, an effector molecule is co-expressed as a fusion
 protein with an Omp-like protein. In this embodiment, the primary effector molecule has
 5 enhanced delivery to the outer membrane of the bacteria. Without intending to be limiting
 as to embodiments, the Omp-like protein is followed by the sequence aa aa aa aa aa aa aa aa
 to direct the effector molecule to the outer membrane, or serves to facilitate the protein to
 the bacterial outer membrane. In an embodiment, the fusion of an effector molecule to an
 Omp-like protein is used to enhance localization of an effector molecule to the periplasm.
 10 In another embodiment, the fusion of an effector molecule to an Omp-like protein is used
 to enhance release of an effector molecule. In specific embodiments, the Omp-like protein
 is at least a portion of OmpA, OmpX, OmpY, OmpZ, OmpF, OmpG, OmpH, OmpJ, a gene-like
 protein, PiloA, PiloB, UtrA, β -lactamase, an autolysin, protein A, endoglucanase,
 15 glycosylhydrolase, lysozyme (PAA), PylA, PylB, PylC, PylD, PylE, PylF, PylG, PylH, or a
 major outer membrane β -proteobacter (such as LPS) etc. In certain embodiments of the
 invention, the signal sequence is constructed to cause hydrolysis (e.g., by the bacteria
 or replacement of amino acids within the signal sequence with hydrolytic amino acids, e.g.,
 threonine). As illustrative examples, see SEQ ID NOs 1-74, *seqs*.
 20 In other embodiments of the invention, a fusion protein of the invention exemplifies
 a membrane-spanning protein. The protein may be a transmembrane protein or a surface
 protein or a protein that is embedded in the membrane. In certain embodiments of the
 invention, the fusion protein is constructed to cause hydrolysis (e.g., by the bacteria
 or replacement of amino acids within the signal sequence with hydrolytic amino acids, e.g.,
 25 threonine). As illustrative examples, see SEQ ID NOs 1-74, *seqs*.
 In an exemplary mode of the invention, the Omp-like protein is OmpA, the same
 genetic material to the construction of OmpA-like fusion proteins as applied to other Omp
 fusion proteins, helping to avoid the structural configurations of the specific Omp-like
 protein.
 30 For example, the native OmpA protein contains eight well-defined transmembrane
 β -strands within the 770 amino acid N-terminal domain of the protein. Between each pair
 of transmembrane domains is an extracellular or transmembrane loop, depending on the
 direction of assembly of the transmembrane domain. The C-terminal domain consists of
 150 amino acids which are located intracellularly and presumably control the
 35 pleiotropic activity controlling the periplasmic space. Fusion protein vectors have been generated
 that facilitate the generation of OmpA fusion proteins. For example, Hobson et al. (1995,
Dev. Biol. Stand. 84:255-262) have developed vectors containing the OmpA open reading

- 52 -

Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

33 Similar fusion problems may be encountered with any of the Camp-like proteins using the strategies described above in terms of CampA. In the construction of such fusion proteins, as with an argument in case of continuous skill in this art, the selection of the portion

doi:10.1017/S0007122614000091

[illegible]

In another preferred embodiment, a fusion protein comprises a signal peptide, a ferritin peptide and an effector molecule. In a suitable mode of this embodiment, attenuated host-derived bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules and/or to express one or more fusion proteins comprising a signal peptide, a ferritin peptide and an effector molecule. In accordance with this mode, the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

In another preferred embodiment, a host protein comprises a signal peptide, a proteolytic cleavage site, a heavy peptide and an effector molecule to a solid carrier or a water-soluble matrix. In a specific embodiment, polynuclear aromatic hydrocarbons are incorporated in liposomes or other suitable solid matrices according to a known fusion process comprising a signal sequence, a proteolytic cleavage site, a heavy peptide and an effector molecule. Interaction with the membrane, the effector molecule such as a polymer or molecular filter particles.

By way of out-lining example, which activity may be enhanced by addition of latent herpes particles derived from HIV TAT source also dox virus VP22, known as dox.

DECLARATION

[illegible]

Construction of fusion proteins for expression in bacteria are well known in the art and such methods are within the scope of the invention. (See, e.g., Nickbarg, S., 1996, *Molecular Biology* 12:128 which is incorporated herein by reference in its entirety).

23 56. EXTENSION VEGETA

The present findings provide additional support for the view that bacteria which have been assigned to cause acute or chronic primary effusion pleuritis are, in fact, not so specific effector organisms. The infection processes stimulated within the pleural cavities comprising effusion pleuritis (which are caused by a pleural or transudate-like effusion) are, in a generalised environment of the infection, also stimulated in several types of bacteria in *Salmonella*. When these data are taken together (e.g. primary or secondary) it is apparent that in an altered state of infection, such as *Salmonella*, the effector molecules may be mediated by the same pathway to stimulate cells, or by more than one pleural or cellular effector molecule. The invasion of the pleural cavity translocated transmembrane bacteria comprising effusion pleuritis may be preceded by a pleural and transudate which is transported into the pleural cavity. Associated effector molecules may be

(153)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

10 **FIGURE 1**
 endogenous to an organism (such as a bacterium), such as *Salmonella*, or may be
 introduced into the organism (such as a bacterium) (e.g., by introduction of a nucleic
 acid which encodes the effector molecule, such as a plasmid, transmissible plasmid, or
 transposon, etc.) with the nucleic acid molecule encoding the effector molecule
 15 becomes integrated into the genome of the organism (such as a bacterium). In a
 preferred embodiment of the invention, the organism (such as a bacterium) is
Salmonella. The invention provides a nucleic acid molecule encoding an effector molecule
 which is specifically linked to an appropriate promoter. A promoter operably
 linked to a nucleic acid molecule encoding an effector molecule may be *Salmonella* (e.g.,
Salmonella or *Escherichia coli*), or may be in the genome of the organism encoding the effector
 molecule.

20 The nucleic acid molecule encoding for an effector molecule of the invention or a
 specifically active analog or fragment or other derivatives thereof, can be inserted into an
 appropriate expression vector, e.g., a plasmid which encodes the necessary elements for
 the transcription and translation of the encoded protein coding sequence. The accuracy
 25 transcription and translation signals can be supplied by the effector molecule or by an
 external promoter. Alternatively, an expression vector is constructed by inserting a
 specific DNA sequence encoding a desired protein together with suitable transcription
 initiation and translation signals in operable reading frame with a functional promoter
 using one of a variety of methods known in the art for the construction of DNA. See,
 generally, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring
 30 Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., 1995, *Current Protocols in
 Molecular Biology*, Greene Publishing, New York, NY. These methods may include in
 vivo recombination (e.g., *Salmonella* or *Escherichia coli*) or in vitro recombination (genetic
 recombination). The invention provides a nucleic acid molecule encoding an effector
 molecule which is specifically linked to an appropriate promoter.

35 The present invention also provides a nucleic acid molecule which encodes
 a protein which is encoded by or more than one nucleic acid molecule, or a more effector
 molecule. The invention provides a nucleic acid molecule encoding a protein which
 encodes a protein which is encoded by a plasmid or transmissible vector. When more than
 one effector molecule is encoded by a plasmid or transmissible vector, the effector
 40 molecules may be encoded by the same plasmid or vector, or by more than one
 plasmid or vector. The invention also provides a nucleic acid molecule encoding a protein
 which is encoded by a plasmid or transmissible vector. The invention also provides a
 nucleic acid molecule which is encoded by a plasmid or transmissible vector. The
 45 nucleic acid molecule encoding for a protein of the invention can be inserted into an

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/ticontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/17/2007

(155)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

[000000000]

[000000000]

In certain embodiments of the invention, the phage of the bacteriophage transposon plasmid, i.e., comprises a transposon in which the transposon encoding an effector molecule of interest is located. Transposon plasmids contain transposon constructs which encode transposon integrated into the bacterial genome. Accordingly, a mobile solid encoding the effector molecule on bacteriophage is inserted into the transposon construct. Thus, a transposon construct integrates the effector into the bacterial genome. The coding sequence of the effector molecule can be operably linked to a promoter, or can be promoterless. In the latter case, expression of the effector molecule is driven by a promoter at the site of transposon insertion into the bacterial genome. Cohesion of bacteria having a transposon insertion are assessed for expression levels that meet the requirements of the invention, e.g., that express sufficient levels of effector to promote tumor regression, cure, or regression.

In certain embodiments, transposons in the transposon, the transposon plasmid construct, encode the inverted repeats of the transposon, a transposon gene to catalyze the insertion of the transposon into the bacterial genome without being excised along with the transposon, so that bacterial strains with stably transposon insertions are generated.

Transposons to be utilized by the present invention include but are not limited to Tn3, Tn4, Tn5 and Tn7. In a preferred embodiment, the transposon plasmid is pUC223 (ATCC) having an *amp^r* resistance gene located outside the Tn3 insertion site and the mobile solid encoding one or more effector molecule(s) is inserted between the two Tn3 insertion elements (e.g., within the transposon cassette). Preferably, the construct is made such that no effector sequences encoding other elements is inserted between the two Tn3 insertion elements. In specific embodiments, such elements may optionally include (1) a promoterless entry sequence (e.g., *lacZ*, *lacY*, *lacZ*, etc.) for positive selection of the bacteria containing the plasmid (2) a *REP* gene, (3) a promoter for the effector molecule (such as *trc*) operably linked to the effector molecule encoding the one or more primary effector molecule(s) such as Tn3-*trc*, or a fusion protein formed e.g., as *OrpA-Tn3-*trc** fusion), (4) a terminator for the effector molecule encoding the one or more effector molecule(s).

In one embodiment, after the transposon of the plasmid is integrated and selection of these strains having the desired construct using the appropriate resistance properties encoded by the plasmid, the multi-locus collection is removed through plasmid loss and strains having a chromosomal transposon locus are chosen for administration to human subjects (e.g., by phage or selective methods).

In another specific embodiment, the plasmid pT3 is used which comprises an *amp^r* resistance gene specifically transposon gene and a *uvrA* gene, controlling the *uvrA* sequence for a *uvrA* gene and an *amp^r*. In another specific embodiment, the plasmid pT3-*amp^r* is used which comprises an *amp^r* resistance gene specifically transposon gene

- 58 -

(366)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

FIGURE 1
and a polynucleotide, comprising the coding sequence for a polynucleotide sequence, and
a poly(A) signal sequence, a release factor, and an MCS.

In a preferred embodiment, a nucleotide sequence for selection of a nucleotide
sequence is provided.

- a) a nucleotide sequence, for example, a sequence, located outside
of the coding sequence, e.g., outside of the nucleotide
sequence;
- b) a nucleotide sequence corresponding to the nucleotide sequence located in
the nucleotide state (e.g., not) as well as a released nucleotide and
nucleotide for the nucleotide state, having a sequence. The sequence is
preferably located immediately following the MCS sequence located
sequence;
- c) optionally, between the right and left nucleotide sequence is a nucleotide
sequence encoding a release-inducing nucleotide (e.g., DAP); and
- d) a nucleotide sequence located between the right and left nucleotide
sequence, encoding a nucleotide sequence located within the present, for the
sequence of the nucleotide. The MCS is preferably located
immediately following the nucleotide sequence (not a nucleotide) and just
prior to the right MCS sequence.

In nucleotide sequence, the gene expression encoding nucleotide sequence of
nucleotide sequence into the nucleotide sequence, located in the nucleotide of the gene expression
sequence.

In yet another embodiment, the nucleotide sequence is a nucleotide sequence (nucleotide
sequence) which is self-restrained expression, i.e., is self-restrained, in a nucleotide
sequence.

For example, in one embodiment of the nucleotide, the nucleotide sequence is
nucleotide by providing a function which the nucleotide, such as a nucleotide, is located in
the nucleotide of the nucleotide, having the function, and is located in the nucleotide
of the nucleotide. In one embodiment, the nucleotide of the nucleotide is a nucleotide
sequence which is self-restrained expression, i.e., is self-restrained, in a nucleotide
sequence.

The nucleotide which encodes the nucleotide sequence can be selected
by providing the nucleotide sequence which has the nucleotide sequence only the nucleotide
sequence, such as the nucleotide sequence, not a nucleotide. In a highly preferred aspect
of the nucleotide, the nucleotide of the nucleotide is a nucleotide sequence which is self-restrained
expression, i.e., is self-restrained, in a nucleotide sequence.

The nucleotide which encodes the nucleotide sequence can be selected
by providing the nucleotide sequence which has the nucleotide sequence only the nucleotide
sequence, such as the nucleotide sequence, not a nucleotide. In a highly preferred aspect
of the nucleotide, the nucleotide of the nucleotide is a nucleotide sequence which is self-restrained
expression, i.e., is self-restrained, in a nucleotide sequence.

The nucleotide which encodes the nucleotide sequence can be selected
by providing the nucleotide sequence which has the nucleotide sequence only the nucleotide
sequence, such as the nucleotide sequence, not a nucleotide. In a highly preferred aspect
of the nucleotide, the nucleotide of the nucleotide is a nucleotide sequence which is self-restrained
expression, i.e., is self-restrained, in a nucleotide sequence.

The nucleotide which encodes the nucleotide sequence can be selected
by providing the nucleotide sequence which has the nucleotide sequence only the nucleotide
sequence, such as the nucleotide sequence, not a nucleotide. In a highly preferred aspect
of the nucleotide, the nucleotide of the nucleotide is a nucleotide sequence which is self-restrained
expression, i.e., is self-restrained, in a nucleotide sequence.

• 59 •

940 09.15291

GRATINGS

agenerate nonfunctional (dehydratase) gene encoding an enzyme in the DAP biosynthesis pathway. Gram-negative bacteria with little or no ability can be grown by supplying DAP to the culture media. However, e.g. the expression phenotype of the insertion, that carry the *ara* gene sequence usually linked to a heterologous or homologous promoter can be selected for the presence of the *ara* gene sequence in bacteria that lack *ara* activity in the absence of DAP (see, e.g., U.S. Patent No. 5,296,483 to Carls, 1993).

Other non-enzymatic selection systems are based on the use of and are within the scope of the invention. For example, a selection system utilizing a phage that comprising a stable head and less stable tail-tail may be used to select for bacteria which produce such a phage.

In another substitution, the expression vehicle is an extrachromosomal plasmid that is selectable by non-selective means, for example a colicin plasmid. As noted herein, a colicin plasmid naturally encodes a colicin toxin and an anti-toxin, the colicin toxin being more critical than the anti-toxin, such that any bacteria which loses the colicin plasmid is killed as a result of the production of the colicin toxin. In a preferred embodiment, the colicin toxin is the large subunit of ColECS and the anti-toxin is the small subunit of ColECS.

In other environments of the laboratory, the expression of the *lacZ* gene, more specifically a *phage* λ vector, has preferred an environment, the *lacZ* gene was competent the *E. coli* vector factor competes a temperature-sensitive λ receptor which is functional at 50°C but not 37°C. Consequently, the bacterial host can be grown and manipulated at 30°C without expression of the primary antibody secreting effector molecule which may be toxic to the bacterial cell. Upon introduction of the bacterial strain into the subject, the λ receptor is identified by secreted body temperature and expression of the primary antibody molecule, and conformally a molecular effector molecule, is activated.

25 Expression of a nucleic acid sequence encoding an effector nucleic acid or fusion protein may be regulated by a second nucleic acid sequence so that the effector nucleic acid is expressed in a bacterium transformed with the recombinant DNA molecule. For example, expression of an effector nucleic acid may be controlled by any suitable stabilizer or effector known in the art. A promoter/chance may be homologous (i.e., native) or heterologous

for the cell surface. Promoters which may be used to control the expression of an effector molecule, e.g. a cytotoxin, or a target protein in bacteria include, but are not limited to, prokaryotic promoters such as the β -lactamase promoter (Villa-Komarova *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3327-3332), or the lac promoter (O'Connor *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:371-375, Synthetic Animals, 1988, 3:6276-64). Other promoters encompassed by the present invention include, but are not limited to, *lacI*, *lacZ*, *T7*, *gfp*, *hanta*, *p₁*, *lacids*, *lacE*, *pac*, *phd*, *phdII* (Shen), *trc*, *lacA*, *gla*, *glaB*, *glaC*, *glaD*, *glaE*, *glaF*, *glaG*, *glaH*, *glaI*, *glaJ*, *glaK*, *glaL*, *glaM*, *glaN*, *glaO*, *glaP*, *glaQ*, *glaR*, *glaS*, *glaT*, *glaU*, *glaV*, *glaW*, *glaX*, *glaY*, *glaZ*, *glaAA*, *glaAB*, *glaAC*, *glaAD*, *glaAE*, *glaAF*, *glaAG*, *glaAH*, *glaAI*, *glaAJ*, *glaAK*, *glaAL*, *glaAM*, *glaAN*, *glaAO*, *glaAP*, *glaAQ*, *glaAR*, *glaAS*, *glaAT*, *glaAU*, *glaAV*, *glaAW*, *glaAX*, *glaAY*, *glaAZ*, *glaBA*, *glaBB*, *glaBC*, *glaBD*, *glaBE*, *glaBF*, *glaBG*, *glaBH*, *glaBI*, *glaBJ*, *glaBK*, *glaBL*, *glaBM*, *glaBN*, *glaBO*, *glaBP*, *glaBQ*, *glaBR*, *glaBS*, *glaBT*, *glaBU*, *glaBV*, *glaBW*, *glaBX*, *glaBY*, *glaBZ*, *glaCA*, *glaCB*, *glaCC*, *glaCD*, *glaCE*, *glaCF*, *glaCG*, *glaCH*, *glaCI*, *glaCJ*, *glaCK*, *glaCL*, *glaCM*, *glaCN*, *glaCO*, *glaCP*, *glaCQ*, *glaCR*, *glaCS*, *glaCT*, *glaCU*, *glaCV*, *glaCW*, *glaCX*, *glaCY*, *glaCZ*, *glaDA*, *glaDB*, *glaDC*, *glaDD*, *glaDE*, *glaDF*, *glaDG*, *glaDH*, *glaDI*, *glaDJ*, *glaDK*, *glaDL*, *glaDM*, *glaDN*, *glaDO*, *glaDP*, *glaDQ*, *glaDR*, *glaDS*, *glaDT*, *glaDU*, *glaDV*, *glaDW*, *glaDX*, *glaDY*, *glaDZ*, *glaEA*, *glaEB*, *glaEC*, *glaED*, *glaEE*, *glaEF*, *glaEG*, *glaEH*, *glaEI*, *glaEJ*, *glaEK*, *glaEL*, *glaEM*, *glaEN*, *glaEO*, *glaEP*, *glaEQ*, *glaER*, *glaES*, *glaET*, *glaEU*, *glaEV*, *glaEW*, *glaEX*, *glaEY*, *glaEZ*, *glaFA*, *glaFB*, *glaFC*, *glaFD*, *glaFE*, *glaFF*, *glaFG*, *glaFH*, *glaFI*, *glaFJ*, *glaFK*, *glaFL*, *glaFM*, *glaFN*, *glaFO*, *glaFP*, *glaFQ*, *glaFR*, *glaFS*, *glaFT*, *glaFU*, *glaFV*, *glaFW*, *glaFX*, *glaFY*, *glaFZ*, *glaGA*, *glaGB*, *glaGC*, *glaGD*, *glaGE*, *glaGF*, *glaGG*, *glaGH*, *glaGI*, *glaGJ*, *glaGK*, *glaGL*, *glaGM*, *glaGN*, *glaGO*, *glaGP*, *glaGQ*, *glaGR*, *glaGS*, *glaGT*, *glaGU*, *glaGV*, *glaGW*, *glaGX*, *glaGY*, *glaGZ*, *glaHA*, *glaHB*, *glaHC*, *glaHD*, *glaHE*, *glaHF*, *glaHG*, *glaHH*, *glaHI*, *glaHJ*, *glaHK*, *glaHL*, *glaHM*, *glaHN*, *glaHO*, *glaHP*, *glaHQ*, *glaHR*, *glaHS*, *glaHT*, *glaHU*, *glaHV*, *glaHW*, *glaHX*, *glaHY*, *glaHZ*, *glaIA*, *glaIB*, *glaIC*, *glaID*, *glaIE*, *glaIF*, *glaIG*, *glaIH*, *glaII*, *glaIJ*, *glaIK*, *glaIL*, *glaIM*, *glaIN*, *glaIO*, *glaIP*, *glaIQ*, *glaIR*, *glaIS*, *glaIT*, *glaIU*, *glaIV*, *glaIW*, *glaIX*, *glaIY*, *glaIZ*, *glaJA*, *glaJB*, *glaJC*, *glaJD*, *glaJE*, *glaJF*, *glaJG*, *glaJH*, *glaJI*, *glaJJ*, *glaJK*, *glaJL*, *glaJM*, *glaJN*, *glaJO*, *glaJP*, *glaJQ*, *glaJR*, *glaJS*, *glaJT*, *glaJU*, *glaJV*, *glaJW*, *glaJX*, *glaJY*, *glaJZ*, *glaKA*, *glaKB*, *glaKC*, *glaKD*, *glaKE*, *glaKF*, *glaKG*, *glaKH*, *glaKI*, *glaKJ*, *glaKK*, *glaKL*, *glaKM*, *glaKN*, *glaKO*, *glaKP*, *glaKQ*, *glaKR*, *glaKS*, *glaKT*, *glaKU*, *glaKV*, *glaKW*, *glaKX*, *glaKY*, *glaKZ*, *glaLA*, *glaLB*, *glaLC*, *glaLD*, *glaLE*, *glaLF*, *glaLG*, *glaLH*, *glaLI*, *glaLJ*, *glaLK*, *glaLL*, *glaLM*, *glaLN*, *glaLO*, *glaLP*, *glaLQ*, *glaLR*, *glaLS*, *glaLT*, *glaLU*, *glaLV*, *glaLW*, *glaLX*, *glaLY*, *glaLZ*, *glaMA*, *glaMB*, *glaMC*, *glaMD*, *glaME*, *glaMF*, *glaMG*, *glaMH*, *glaMI*, *glaMJ*, *glaMK*, *glaML*, *glaMM*, *glaMN*, *glaMO*, *glaMP*, *glaMQ*, *glaMR*, *glaMS*, *glaMT*, *glaMU*, *glaMV*, *glaMW*, *glaMX*, *glaMY*, *glaMZ*, *glaNA*, *glaNB*, *glaNC*, *glaND*, *glaNE*, *glaNF*, *glaNG*, *glaNH*, *glaNI*, *glaNJ*, *glaNK*, *glaNL*, *glaNM*, *glaNN*, *glaNO*, *glaNP*, *glaNQ*, *glaNR*, *glaNS*, *glaNT*, *glaNU*, *glaNV*, *glaNW*, *glaNX*, *glaNY*, *glaNZ*, *glaOA*, *glaOB*, *glaOC*, *glaOD*, *glaOE*, *glaOF*, *glaOG*, *glaOH*, *glaOI*, *glaOJ*, *glaOK*, *glaOL*, *glaOM*, *glaON*, *glaOO*, *glaOP*, *glaOQ*, *glaOR*, *glaOS*, *glaOT*, *glaOU*, *glaOV*, *glaOW*, *glaOX*, *glaOY*, *glaOZ*, *glaPA*

ACKNOWLEDGMENTS

In another general embodiment, the promoter has additional effect in the target environment, for example, a promoter that is activated by the recipient's environment of the host cell as the *ppv* promoter of the target cell. Activation of the *ppv* promoter is dependent on the T7E1 promoter of the target cell (SIEGEL et al., 1983; J. Biol. Chem. 1986; 261: 7371). In a specific embodiment, the *ppv* promoter is a natural promoter that is induced at higher levels under certain conditions than the *ppv* *ppv* promoter, such as the *ppv*1200 promoter where expression is responsive to temperature and/or light (induced by *ppv*2044-*ppv*1200) (Lorenz et al., 1997; J. Biol. Chem. 1997; 272: 19569-1971). In another embodiment, the *ppv* promoter is a fused promoter or set, e.g., the *ppv*2044-*ppv*1200 promoter (Lorenz et al., 1997). In another embodiment, the *ppv* promoter is a synthetic promoter that is inducible by a specific agent or condition (Lorenz et al., 1997; J. Biol. Chem. 1997; 272: 19569-1971) and can be used according to the methods of the present invention.

Allosterically, the promoter can be repressed or derepressed, such as the *ara* promoter of the T4 λ 10 system. In uninduced *Escherichia coli*, *ara* promoter is repressed, for example due to *araC* DNA-protein activity (not by direct binding of *araC* to a sequence just below promoter) with the associated protein-coupled repressor of the *ara* system in appropriate DNA conformation. Although the *ara* inducible expression system was originally described for *Escherichia coli* or *Salmonella typhimurium* (Fargnoli and Cavaletto, 1982; Cavaletto, 1983;2195-1959) and mammalian cells (Ling and Goldfarb, 1984; Gao 1983,2027), recent studies reveal its applicability to bacterial cells. For example, Shteyn et al. (1989, Gao 226-232) have shown the *ara* induction of the strictly defined gene *gus* upon induction with *araC* is identical to the *ara* promoter. An advantage of this promoter is that it is induced at very low levels of anhydrotetracycline, approximately 1/104 of the doses needed for antibiotic activity.

Once a plasma is converted containing an effective molecule or factor protein is introduced into the attenuated mouse-megakaryocyte, efficient molecular expansion or fusion protein expansion can be adapted by any method known in the art including but not limited to biological activity, enzyme activity, Western blot analysis, and Western blot analysis. (See Stancovski et al. 1988, *Molecular Biology of a Laboratory Manual*, Cold

WTD 01.05.2012

CONTENTS

Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, New York, NY).

57. COORDINATION TREATY

In certain cases of disease, attenuated immune responses may be associated with a dysregulation of the immune system. For example, in patients with severe combined immunodeficiency (SCID), the immune system is severely compromised, and patients are highly susceptible to opportunistic infections. In patients with HIV, the immune system is severely compromised, and patients are highly susceptible to opportunistic infections. In patients with HIV, the immune system is severely compromised, and patients are highly susceptible to opportunistic infections. In patients with HIV, the immune system is severely compromised, and patients are highly susceptible to opportunistic infections.

The present invention includes the sequential or simultaneous administration of an anti-cancer agent and ethanolic solvent-targeted bacteria. The invention encompasses combinations of anti-cancer agents and solvents and/or targeted bacteria that are additive or synergistic.

The interaction also encompasses combinations of GLS or more anti-tumor agents and intratumoral tumor-injected bacteria that have different strains of vectors. Such a combination provides an increased therapeutic benefit as the direction of these therapeutic 35 whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combination therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

2001-2002

607470

The present invention also includes the sequential or concurrent administration of an anti-oncogene agent and a targeted tumor-suppressing factor, a ligand and a receptor, or a gene product and a molecule encoding one or more effector molecules under fusion proteins. The invention encompasses combinations of anti-oncogene agents and targeted tumor-suppressing factors, ligands to receptors or where a protein and a molecule encoding one or more effector molecules under fusion proteins that act as additive or synergistic.

10 The use of an alternative combination of one or more anti-cancer agents and standard non-targeted therapies employed to improve one or more clinical outcomes resulting from an in vivo combination of the anti-cancer agents is to have different effect of action. Such a combination therapy is an improved therapy based on the dual action of these compounds whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combination therapy of the present invention yields an improved efficacy over each agent used in a single agent therapy.

4.2. METHODS AND COMPOSITIONS FOR DELIVERY

The literature provides methods by which one or many primary infection medications which may be given when infection systemically to a host, can be delivered locally to tissues by an associated transdermal reservoir device with minimal toxicity to the host. The case study discloses, the primary infection symptoms is useful to treat psoriasis, lymphomas, carcinomas, or other solid tissue cancers. In certain cases, the transdermal reservoir device, with the associated device is useful for the treatment of leukemia in patients at the site of the lesion.

According to the present evidence, the structural properties of bacterial viruses resembling a nucleic acid molecule encoding one or more primary effector molecules and optionally one or more primary effector molecules are advantageously used in methods to inhibit the growth of a tumor, reduce the volume of a tumor, or prevent the spread of tumor cells in an animal, including a human subject, having solid and/or hematogenous cancer.

The present literature provides methods for deriving sets of more primary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an individual in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an intratumoral microinjection of a cytotoxic agent or an agent capable of inducing tumor necrosis and/or more primary effector molecules preferably linked to one or more proapoptotic protein(s).

The present invention also provides methods for deriving sets of more primary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an individual in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an intratumoral microinjection of a cytotoxic agent or an agent capable of inducing tumor necrosis and/or more primary effector molecules preferably linked to one or more proapoptotic protein(s).

(171)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

with cancer
is a TNP family member, a cytosolic peptide or polypeptide, an anti-apoptotic factor, a tumor inhibitory enzyme, or a functional ligand or ligand.

The present invention provides methods for delivering one or more fusion proteins of the invention for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-associated bacteria comprising one or more and at least two subunits encoding one or more fusion proteins of the invention optionally linked to one or more apoptosis inducers. The protein in tandem may provide stability, the delivering one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules to the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-associated bacteria comprising one or more and at least two subunits encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules optionally linked to one or more apoptosis inducers.

In a preferred embodiment, the attenuated tumor-associated bacteria is *Salmonella*. In another embodiment, the attenuated tumor-associated bacteria comprises an enhanced release system. In a preferred embodiment, the animal is a human. In a highly preferred embodiment, the animal is a human.

The invention also provides a combination of one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules which are delivered by an attenuated tumor-associated bacteria such as *Salmonella*. The invention also provides a combination of different attenuated tumor-associated bacteria carrying one or more different primary effector molecules and/or optionally, one or more different secondary effector molecules.

The invention also provides delivery of one or more fusion proteins of the invention which are delivered by an attenuated tumor-associated bacteria such as *Salmonella*. The invention also provides a combination of different attenuated tumor-associated bacteria carrying one or more different fusion proteins and/or optionally, one or more different effector molecules.

Solid tumor cancers, but are not limited to, sarcomas, carcinomas and other solid tumor cancers, including, but not limited to, gastric cancer, cancer of the small intestine, colon cancer, prostate cancer, cervical cancer, uterine cancer, lung cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, neuroblastoma, glioma, pancreatic cancer, stomach cancer, liver cancer, colorectal cancer, pancreatic cancer, breast cancer, bladder cancer, and esophageal cancer. The subject is particularly an animal, including but not limited to animals such as cows, pigs, chickens, dogs, cats, horses, etc., and is preferably a human, and a rodent.

* 66 *

(372)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

N000000

N000000000

preferably human. As used herein, treatment of a solid tumor, leukemia but is not limited to, inhibiting tumor growth, inhibiting tumor cell proliferation, inducing tumor cell death, or inhibiting the spread of tumor cells to other parts of the body (metastasis).

The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters.

The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the bacteria operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the bacteria and one or more effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters.

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-inactivated bacteria. The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more primary effector molecules and optionally one or more secondary effector molecules, and a pharmaceutically acceptable carrier. The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more fusion proteins of the bacteria and optionally, one or more effector molecules. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of an attenuated tumor-inactivated bacteria comprising one or more fusion proteins of the bacteria and optionally one or more effector molecules, and a pharmaceutically acceptable carrier.

In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopoeia or other generally recognized pharmacopoeia for use in animals, and more particularly in human. The term "vector" refers to a plasmid, phage, cosmid, or

* 62 *

(173)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Notes

Comments

vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers are in
 suitable form, such as suspensions, containing those of suspensions, solid, suitable or
 syringeable, such as parenteral, aqueous oil, emulsion, aqueous oil, oil, oil, and the
 like. Saline is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered
 intravenously. Other vehicles and aqueous solutions and glycerol solutions can also be
 employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical
 carriers include starch, glucose, lactose, mannose, gelatin, milk, rice, olive oil, water,
 5 gel, sodium phosphate, glycerol monostearate, water, sodium chloride, distilled water,
 alcohol, polyethylene glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can
 also contain other aqueous or emulsifying agents, or pH buffering agents.
 These compositions can take the form of emulsions, suspensions, solutions, tablets, pills,
 capsules, powders, compressed tablets, formulations and the like. Other formulations are
 10 include attached carrier and/or pharmaceutical grade of emulsion, liquid, solid,
 aqueous solution, emulsion, solution, solution, aqueous solution, etc. Examples of
 suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Science"
 by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the
 therapeutic compound, as described herein, in purified form, together with a suitable
 15 amount of carrier so as to provide the form the proper administration to the patient. The
 formulation should enter the mode of administration.

In a preferred embodiment, the composition is formulated in accordance with
 known procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration
 20 to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in
 sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a
 suspending agent and a local anesthetic such as lidocaine to ease pain at the site of the
 injection. Commonly, the ingredients are supplied either separately or mixed together in
 25 a single dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or other dry composition in a
 pharmaceutically suitable container such as an ampoule or vial, indicating the quantity of
 active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed
 with an infusion bottle containing media pharmaceutically grade water or saline. Where the
 composition is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline
 can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

The nature of the pharmaceutical composition of the invention which will be
 effective in the treatment or prevention of a solid tumor cancer will depend on the nature of
 the cancer, and can be determined by standard clinical techniques. In addition, the dose
 may vary optically by the type of the help of the clinical techniques. The precise
 30 dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and
 the resistance of the cancer, and should be decided according to the judgment of the
 physician and each patient's circumstances. However, suitable dosage ranges are

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/17/2007

PC-COMMUNITY

The present invention includes the essential or nonessential administration of pharmaceutical compositions of the invention and/or as well as agent such as chemotherapeutic agent. In a specific embodiment, the pharmaceutical compositions of the invention is administered orally for 2, 3, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 21, 24, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410, 412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 562, 564, 566, 568, 570, 572, 574, 576, 578, 580, 582, 584, 586, 588, 590, 592, 594, 596, 598, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 736, 738, 740, 742, 744, 746, 748, 750, 752, 754, 756, 758, 760, 762, 764, 766, 768, 770, 772, 774, 776, 778, 780, 782, 784, 786, 788, 790, 792, 794, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 824, 826, 828, 830, 832, 834, 836, 838, 840, 842, 844, 846, 848, 850, 852, 854, 856, 858, 860, 862, 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, 1086, 1088, 1090, 1092, 1094, 1096, 1098, 1100, 1102, 1104, 1106, 1108, 1110, 1112, 1114, 1116, 1118, 1120, 1122, 1124, 1126, 1128, 1130, 1132, 1134, 1136, 1138, 1140, 1142, 1144, 1146, 1148, 1150, 1152, 1154, 1156, 1158, 1160, 1162, 1164, 1166, 1168, 1170, 1172, 1174, 1176, 1178, 1180, 1182, 1184, 1186, 1188, 1190, 1192, 1194, 1196, 1198, 1200, 1202, 1204, 1206, 1208, 1210, 1212, 1214, 1216, 1218, 1220, 1222, 1224, 1226, 1228, 1230, 1232, 1234, 1236, 1238, 1240, 1242, 1244, 1246, 1248, 1250, 1252, 1254, 1256, 1258, 1260, 1262, 1264, 1266, 1268, 1270, 1272, 1274, 1276, 1278, 1280, 1282, 1284, 1286, 1288, 1290, 1292, 1294, 1296, 1298, 1300, 1302, 1304, 1306, 1308, 1310, 1312, 1314, 1316, 1318, 1320, 1322, 1324, 1326, 1328, 1330, 1332, 1334, 1336, 1338, 1340, 1342, 1344, 1346, 1348, 1350, 1352, 1354, 1356, 1358, 1360, 1362, 1364, 1366, 1368, 1370, 1372, 1374, 1376, 1378, 1380, 1382, 1384, 1386, 1388, 1390, 1392, 1394, 1396, 1398, 1400, 1402, 1404, 1406, 1408, 1410, 1412, 1414, 1416, 1418, 1420, 1422, 1424, 1426, 1428, 1430, 1432, 1434, 1436, 1438, 1440, 1442, 1444, 1446, 1448, 1450, 1452, 1454, 1456, 1458, 1460, 1462, 1464, 1466, 1468, 1470, 1472, 1474, 1476, 1478, 1480, 1482, 1484, 1486, 1488, 1490, 1492, 1494, 1496, 1498, 1500, 1502, 1504, 1506, 1508, 1510, 1512, 1514, 1516, 1518, 1520, 1522, 1524, 1526, 1528, 1530, 1532, 1534, 1536, 1538,

(176)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WE 442270

EPC000602042

radiolabelled molecules according to one or more different methods under further conditions that are additive or synergistic.

The invention also encompasses combinations of radiolabelled agents as a means of direct targeted therapy, a single agent or sequence one or more active and multiple interacting one or more active molecules and/or further conditions that have different uses of action.

- Such a combination provides an improved therapy based on the dual action of these two products whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combination therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used in a single agent therapy.

- In one embodiment, an agent such as a radiolabelled cancer is administered to a pharmaceutical composition of the invention and treated with radiation therapy (e.g., gamma radiation or x-ray radiation). In a specific embodiment, the invention provides methods to treat or prevent cancer that has shown to be refractory to radiation therapy. The pharmaceutical composition may be administered concurrently with radiation therapy. Alternatively, radiation therapy may be administered subsequent to administration of a pharmaceutical composition of the invention, preferably at least an hour, five hours, 12 hours, a day, a week, a month, nonperiodically several months (e.g., up to three months), subsequent to administration of a pharmaceutical composition.

- The radiation therapy administered prior to, concurrently with, or subsequent to the administration of the pharmaceutical composition of the invention can be administered by any method known in the art. For example, but not by way of limitation, x-ray radiation can be administered, in particular, high-energy megavoltage radiation (e.g., 1 to 10 MeV energy) can be used for deep lesions, and electron beam radiation (e.g., x-ray radiation) can be used for skin lesions. Chemotherapy agents such as alkylating agents, such as

- alkylating agents of nitrosourea, carbonyl and ester derivatives may also be administered to complement radiation therapy.

- Additionally, the invention also provides methods of treatment of cancer with a pharmaceutical composition as an alternative to radiation therapy when the radiation therapy has proven to be ineffective, i.e., results in unacceptable or undesirable side effects, for the subject being treated.

- 5.9. DEMONSTRATION OF THERAPEUTIC OR PROPHYLACTIC UTILITY OF PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF THE INVENTION

- The pharmaceutical compositions of the invention are potentially tested *in vivo*, and may *in vivo* be also tested chemically or pharmacologically prior to *in vivo* treatment. For example, *in vivo* assays with tumor or xenografts determine whether administration of a

(177)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

FIG. 10A-10D

FIG. 10A-10D

specific pharmacological composition is indicated, inside is shown cell culture assay in which a particular cancer molecule is grown in culture, and exposed to or otherwise subjected to a pharmacological composition, and the effect of such composition upon the cancer molecule is observed.

Pharmacological compositions of the invention can be tested for their ability to augment activated immune cells by connecting immune cells with a test pharmacological composition or a control and determining the ability of the test pharmacological composition to modulate (e.g., increase) the biological activity of immune cells. The ability of a test composition to modulate the biological activity of immune cells can be assessed by measuring the expression of cytokines or receptors, detecting the proliferation of immune cells, detecting the activation of signaling molecules, counting the effluent fraction of immune cells, or detecting the differentiation of immune cells. Techniques known in the art of cell in the art may be used for measuring these activities. For example, cellular proliferation can be assessed by ³H-thymidine incorporation assays and/or by cell count counts. Cytokine and antigen expression can be assayed, for example, by immunoassays including, but not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, immunohistochemistry and/or immunoassays, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, "sandwich" immunoassays, enzyme-particle assays, precipitin reactions, gel diffusion protein reactions, immunochemical assays, high resolution assays, complement fixation assays, fluorescent/chemic assays, fluorescent immunoassays, protein A immunoassays and RIA immunoassays. The activation of signaling molecules can be assayed, for example, by kinase assays and second-messenger assays (Gibson). The effluent fraction of T-cells can be measured, for example, by a T-cell release assay (see, e.g., Melnick et al., 1992; Chomaz et al., 1993; and Chomaz et al., 1992, *J. Immunology* 148:353-359).

Pharmacological compositions of the invention can be tested for their ability to reduce tumor formation in animals infected from viruses. Pharmacological compositions of the invention can also be tested for their ability to inhibit or cure or neuroprotection associated with a viral tumor cancer. Further, pharmacological compositions of the invention can be tested for their ability to improve the survival of patients suffering from viral tumor cancer. Techniques known in the art of the art can be used to analyze the function of the pharmacological compositions of the invention in animals.

In various specific embodiments, in vitro assays can be carried out with representative cells of cell types involved in a viral tumor cancer, to determine if a pharmacological composition of the invention has a desired effect upon such cell types.

Pharmacological compositions of the invention for use in therapy can be tested in suitable animal model systems prior to testing in humans, including but not limited to, rats,

- 70 -

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/17/2007

CONTENTS

bacteria harboring any plasmid containing the λP_{O_2} or λP_{H_2} promoter, was performed at 30°C

6.1.2. THE RELEASED

[illegible]

6.1.3. THE pTc-NEC FLASHER

29 A phenol- and TBT-free, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-initiated, *in situ* cross-linked epoxy-amine resin-TBT-free casting nucleic acid, was synthesized as follows. Monomer PEG3330 and the ASD prepolymer PEG3322 were used (e.g., U.S. Patent 5,590,893 to Cation, Inc.) as the source of required repeating unit of the core polymer. Glycidyl ether, epichlorohydrin (Matsukawa, 1972, Matsumoto 2890-405). Triamin 2,2'-bis[2,2'-(3,3',3'',3'''-tetrahydro-2H-pyran-2,5-diyl)bis(methyleneoxy)propane] and 1,6-hexamethylenediol with long-term base stability. The observed *in situ* reaction was first observed with triamin-epichlorohydrin and the 3,3' and 3,3'' fragments were isolated. And the *in situ*-cross-linked resin-TBT-free *in situ*-cross-linked epoxy-amine resin, PEG3330 was used. (e.g., U.S. Patent 5,590,893 to Cation, Inc.)

61A THE TECHNOLOGICAL

A plasmid, denoted pTS-SBP, employing transposon-mediated chromosomal integration of the SBP encoding protein and surface promutagenic selection of effector molecules-binding peptides, was constructed as follows. A SBP encoding mycotic

(180)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

4.1.5. THE pT3-3RE2-TNF- α PLASMID
 A plasmid (pT3-3RE2-TNF- α) for the pT3-mediated chromosomal integration of the
 3RE2-TNF- α encoding nucleic acid, was constructed as follows.
 (Figure 4.1.5.1) A 1.8 kb fragment, encoding the 3RE2-TNF- α encoding
 nucleic acid, was ligated into the 5.5 kb pT3-3RE2-TNF- α plasmid to give
 the pT3-3RE2-TNF- α plasmid.

4.2. INTEGRATION OF EFFECTOR MOLECULES INTO THE CHROMOSOME
 The system described here employs a λ -C₁₂ bacteriophage as a vector for
 the integration of the effector molecule into the chromosome. The
 3RE2-TNF- α encoding nucleic acid, was ligated into the 5.5 kb pT3-3RE2-TNF- α
 plasmid to give the pT3-3RE2-TNF- α plasmid.

The pT3-3RE2-TNF- α plasmid containing the effector molecule encoding nucleic acid
 may be inserted into a λ -C₁₂ bacteriophage by a number of methods known in the
 art, including chemical transformation and electroporation. Following the insertion of
 the effector molecule encoding nucleic acid, the bacteriophage is grown in suitable
 growth medium for a minimum of 2 hours, and more preferably 6 hours or longer.
 Bacteriophages are then placed in a medium capable of replacing bacteriophage for infection,
 e.g., 10% methanol. After 1-2 hours, the bacteriophage is removed from the medium,
 and the effector molecule encoding nucleic acid is isolated by the method of
 the present invention.

© 2006 Blackwell Publishing Ltd

6.2.1. DELIVERY AND EXPRESSION OF SALMONELLA-EXPRESSED THERAPY.

L6 with adherent. Bacteria were further characterized for lack of motility, resistance to lysozyme and phagocytosis, and absence of a flagellum. The bacteria were also found to be resistant to penicillin and tetracycline.

is under examination and quantification is continuing for the factors suspected to be

of the junction, selectively inducing a chromosomal integration of the TGF- α encoding nucleic acids were grown overnight, and a passaged sample of the culture was used in

Western blot analysis. Specifically, *ThyA* expression from a representative *recC*,
methylase-defective clone, deleted *pT8-BLUFIT-2* Clon 2, is shown in FIG. 2.
These analysis revealed that bacterial growth, corresponding to 3×10^8 cells of *pT8-
BLUFIT-2* Clon 2 bacteria (Lane 1), required more than 50 ng *ThyA* (Lane 3),
indicating expression of *ThyA* at levels greater than 10 ng/10⁸ cells. Therefore, the
assay *ThyA* can be successfully expressed from a chromosomally integrated, *rec* positive
clone. *ThyA* is essential for growth of *S. flexneri*.

7. EXAMPLE: ATTENUATED TUMOR-TARGETED BACTERIA EXPRESSING ONCA FUSION PROTEINS

[illegible]

(182)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

WU 01/01/97

PCV000012012

and other mechanisms of lysosomes in order to be released into the surrounding environment. Further, polyphosphorylation of certain proteins may aid in biological activity.

A variety of methods known in the art may be used to target an effector molecule to the lysosomes in the periplasm. This example demonstrates that the fusion of the signal peptide to the amino terminus of an effector molecule such as a TNF- α , TRAIL, CD135-related apoptosis-inducing ligand, and interleukin-2 (IL-2) result in the polyphosphorylation and subsequent processing of proteins.

1.1. PROCESSING OF AN ONCO-TNF- α TUMOR PROTEIN

TNF- α expression in five different clones, expressing a plasmid-based or promoter-driven oncop-TNF- α fusion protein in 293T cells, were examined by Western blot analysis of whole cell lysate. Polyphosphorylation was demonstrated by cleavage of the precursor fusion protein in various TNF- α by signal peptides, an enzyme located in the periplasm. In all three cases, following induction with IFN- γ , an expression of TNF- α resulted in the appearance of TNF- α as a doublet migrating at approximately 20 kD (FIG. 5, lanes 6-7), corresponding to both unprocessed and processed forms. For comparison, a soluble protein containing a heterologously-integrated TNF- α encoding nucleic acid, expressing the mature (processed) form of TNF- α , was used as a positive control (FIG. 5, lane 5). TNF- α expression was not observed in bacteria lacking the TNF- α encoding nucleic acid (FIG. 5, lane 3).

These results demonstrated that fusion of the mature human TNF- α protein to the E. coli signal peptide (as depicted in FIG. 4) resulted in polyphosphorylation and processing when expressed in E. coli. Further, it was unknown whether coexpression of a secreted protein would be able to be processed for as a result of overloading the normal secretory apparatus. The present demonstration of expression of a processed oncop-TNF- α fusion protein indicated that the normal secretory apparatus was capable of accommodating the high-level expression of secreted proteins.

1.2. PROCESSING OF AN ONCO-TRAIL TUMOR PROTEIN

The ability of the oncop signal peptide to polyphosphorylate human TNF family members was extended to TRAIL (TNF- α related apoptosis-inducing ligand), another member of the TNF family. For these experiments, a periplasmic-driven TRAIL encoding protein with a secretory (E. coli mature human TRAIL (HsTRAIL), was fused to the coding sequence of the signal peptide (as depicted in FIG. 4). Two different oncop-TRAIL constructs were constructed, one encoding an HsTRAIL and one encoding an HsTRAIL (see FIG. 6 for HsTRAIL construct sequence). Western analysis of both types of clones is shown in FIG. 7. Using an anti-TRAIL antibody, Western blot analysis revealed that bacteria over-expressing the oncop-TRAIL into the periplasm expressed both

- 72 -

(183)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

RESULTS

EXPRESSION

prepared (Fig. 2) and used to express the c-myc-His6 fusion protein (Fig. 2-4). When the fusion protein was expressed, the c-myc-His6 fusion protein was detected by Western blot analysis (Fig. 2-5, lanes 4-7), indicating that the His6 tag provided an efficient processing site.

These results demonstrated that fusion of the mature human TRAIL protein to the c-myc-His6 tag provided a suitable processing site for the fusion protein. It was unknown whether overexpression of the fusion protein would lead to the formation of a stable fusion protein. The c-myc-His6 tag was used as a marker to monitor the expression of the fusion protein. The results of Western blot analysis indicated that the c-myc-His6 tag was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein.

7.3. PROCESSING OF AN ANGIOGENESIS-2 FUSION PROTEIN

A recombinant human angiogenesis-2 (Ang-2) was expressed as a fusion protein. Fusion of mouse (C235A) Ang-2 to the c-myc-His6 tag was performed. The fusion protein was expressed in 293T cells. The fusion protein was detected by Western blot analysis (Fig. 3-4, lanes 4-7). The results of Western blot analysis indicated that the c-myc-His6 tag was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein. The results of Western blot analysis indicated that the c-myc-His6 tag was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein.

7.4. PROCESSING OF AN ANGIOGENESIS-2 FUSION PROTEIN

A recombinant human angiogenesis-2 (Ang-2) was expressed as a fusion protein. Fusion of mouse (C235A) Ang-2 to the c-myc-His6 tag was performed. The fusion protein was expressed in 293T cells. The fusion protein was detected by Western blot analysis (Fig. 3-4, lanes 4-7). The results of Western blot analysis indicated that the c-myc-His6 tag was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein. The results of Western blot analysis indicated that the c-myc-His6 tag was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein.

These results indicate that the fusion protein was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein. The results of Western blot analysis indicated that the c-myc-His6 tag was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein. The results of Western blot analysis indicated that the c-myc-His6 tag was capable of accumulating the high-level expression of the fusion protein.

The results of the fusion protein studies indicate that a secondary effector protein is not required for the fusion protein to be expressed and localized to the target site.

(184)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Nucleic acid

Polynucleotide

known with the a protein signal peptide such as OmpA or TPA. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, other signal sequences can be used to assist with the localization of an effector molecule can be used. As will further be apparent to one of ordinary skill in the art, other effector molecules of the invention can be substituted for the effector molecules described in the example herein.

5 6. EXAMPLES: ANTI-TUMOR EFFICACY OF SALMONELLA *DISPERSE* EXPRESSING TMR MATURIN ENDOPEPTIDASE

15 The following experiment demonstrates that an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* expressing a specific antigenic epitope (e.g., a TMR family protein) can deliver the primary effector to metastatic tumors and cause a decrease in tumor volume.

The ability of TMR to suppress tumor growth was evaluated in a mouse model of colorectal cancer. For these experiments, 1 cm³ tumor fragments, derived from a Colon 35 tumor, were implanted into 20 C57BL/6 mice and tumors were allowed to grow to a mean size of approximately 0.3 g. At about this time points were randomly placed into the following treatment groups (n=10): 1) untreated; 2) *Salmonella* expressing tumor (dysplasia, tumor, and C) (genetic strain); and 3) pTMR-207TMR-C (C strain 2 described above). Mice in each group either received untreated or untreated single intratumoral injections of 1 x 10⁸ cells of the appropriate bacterial strain.

25 Tumor size was measured weekly, beginning at the time of bacterial inoculation. In the group receiving attenuated tumor-targeted *Salmonella* expressing TMR-C, tumor regression was apparent by the second week following treatment, with complete regression observed in 6 of the animals within 4 weeks following inoculation (FIG. 11). Tumors in the untreated group progressively increased in size, whereas tumors in the group treated with the genetically attenuated *Salmonella* (dysplasia, tumor, and C) strain displayed partial regression between weeks 2-4 following treatment, after which tumors progressively increased in size (FIG. 11).

These results demonstrate that attenuated tumor-targeted *Salmonella* are able to express and deliver an effector molecule such as a TMR family member to a tumor. Such 30 *Salmonella* are useful in the treatment of tumors and provide enhanced tumor regression results as compared to parent *Salmonella* strains which do not express the TMR family member.

The administration of complete tumor regression, by *Salmonella* expressing TMR-C to both chronically-integrated murine and, indicate that biologically effective 35 administration can reach both chronically-integrated effector systems involving murine cells.

(185)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W01/2000

PCT/JP00/00421

9. EXAMPLE: ENHANCED DELIVERY OF NUCLEIC ACID MOLECULES BY RNA EXCHANGING RIBOSOMES

In order to demonstrate that DRP activity could enhance the release of a plasmid, *Salmonella* strain was constructed that contains DRP on a plasmid as well as a second plasmid used as a marker for release (pTetR with Amp^r resistant). To study activity of DRP, the *Salmonella* strain expressing DRP was grown in culture by standard methods. The resulting suspension was then added to target cells by co-infection and infection and the desired expression was then added to competent cells and performed a transformation reaction. These "recipient" cells were then plated onto LB agar to look for uptake of the AMP^r marker plasmid. An increase in the number of AMP^r resistant colonies with DRP would indicate that some plasmid was released into the media from cells expressing DRP. Results are summarized in Table 2 below:

Table 2

Plasmid	Average # of Amp ^r Colonies/Transformation
pTetR alone	125
pTetR+DRP (pSVT)	265

These results demonstrate that the presence of DRP increased the amount of amp plasmid secreted to the media. Thus, transformation into "recipient cells" with suspension from cells expressing DRP gave higher amounts of colonies. These results demonstrate that DRP enhanced release of a secondary plasmid molecule, which expressed a nucleic acid plasmid. Accordingly, the results show that DRP is useful for plasmid release or DNA delivery. In addition, these *Salmonella* strains that expressed DRP and were able to deliver DNA and maintain very high level expression as a population.

10. EXAMPLE: DRP EXPRESSION DOES NOT IMPAIR TUMOR-TARGETING OR TUMOR-INDUCING ABILITY OF ATTACHED TUMOR-ANTIGENIC ANTIBODIES

The following example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria can be engineered to express DRP in conjunction with one or more effector molecules to enhance the delivery of effector molecules to target cells without inhibiting the ability of bacteria to target the tumor.

Solid tumor models were obtained by subcutaneous injection of B16 melanoma cells in the right hind flank of C57BL/6 mice. For tumor implantation, cells were

(186)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

N0000000

P00000000

deduced from the fact by experiments, we used, and expressed in plasmid vectors at 2.5x10⁶ cells. An aliquot of 0.2 ml of the cell suspension, for a total of 500 cells, was injected on Day 0. When tumor volumes reached 150-200 mm³, approximately 10 days after implantation, the mice were randomized into three groups of ten mice and each group received a different treatment. The control group (Group 1) was injected 100 µl of PBS. Another group received 0.2 ml containing 2x10⁶ cells of the transduced tumor-targeted chain of Salivarsin VNE0000 (Group 2) on Day 10. The third group received 0.2 ml containing 2x10⁶ cells of the transduced tumor-targeted chain of Salivarsin comprising pSVL, a plasmid carrying the BFP gene under the control of the native promoter (Group 3) on Day 10. The BFP gene is 90% identical to β-gal, although the lacZ gene, whose function is to produce a blue color, is particularly significant in Salivarsin, producing low to moderate levels of the BFP protein, which are further enhanced by the SOS action of the tumor environment. Mice injected with BFP-expressing VNE0000 Salivarsin showed nearly identical anti-tumor response to mice injected with non-BFP-expressing VNE0000, indicating that the survival or tumor-inhibiting ability of these Salivarsin is not altered by BFP expression. It is able to inhibit tumor growth. The expression of BFP expression on intratumoral transplanted Salivarsin is in direct contrast to the effect of the expression of lacZ and HSV-thymidine kinase (HSV-TK), which HSV-TK expression similar to the loss of VNE0000 tumor-inhibiting ability (Thompson et al., 1997, Cancer Res. 57:4537-4545).

Thus, the BFP system can be used to enhance the delivery of primary and/or secondary effector molecules to cancer without further modification.

13. EXAMPLE: pSVL PROMOTER EXPRESSION VECTORS

This example demonstrates the *in vitro* and *in vivo* expression of a nucleic acid molecule encoding a specific nucleic acid under the control of the pSVL promoter in an intratumoral tumor-targeted Salivarsin.

13.1. CONSTRUCTION OF pSVL-PREPARED EXPRESSION PLASMIDS

The pSVL promoter was cloned by PCR amplification of the region from an intratumoral culture of VME type Salivarsin epiblasts (ATCC 14228) using the following primers: Forward: 5'-AGT CTA GAG ATG CAG GCG AAG AAG GCG (SEQ ID NO:15) Reverse: 5'-AAC CAT GGA GTG ACC CTC AGT TTT G (SEQ ID NO:16). The PCR conditions consisted of 1 cycle at 95°C for 5 minutes, 30 cycles of 94°C for 1 minute, 45°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes and 1 cycle of 72°C for 10 minutes. The PCR product was cloned into the PCR 2.1 cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, California), and is referred to as pSVL-PCR 2.1.

The pSVL-PCR 2.1 vector was digested with NotI and XbaI. The pSVL-PCR 2.1

- 79 -

(187)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Nucleotide

Protein

was gel isolated and ligated into the p-gal plasmid vector digested with the same enzymes. XbaI (Vanguard Chemicals No. 264402) is a prokaryotic p-gal plasmid generated by cloning the PstI gene reading frame into pUC19. The resultant plasmid was called p-gal-PGAL.

11.2. IN VITRO EXPRESSION OF p-gal-PGAL AND MEASUREMENT OF p-gal ACTIVITY

Solomon Islands YSI455 (CC14 in FIG. 11A) for the specific make up of the strain, see WO96/02231 or VME20008 (CC16 in FIG. 11A) both using p-gal-PGAL were grown under the same or similar conditions to an OD₆₀₀ of ~0.5-0.6. p-gal activity was assayed by the method of Briggs and Low (1994, J. Mol. Biol. 234:487-497). The results are shown in FIG. 11A, and demonstrate approximately 14- to 24-fold induction of p-gal activity upon growth of the bacteria under ascorbate conditions.

11.3. IN VITRO EXPRESSION OF p-gal-PGAL AND MEASUREMENT OF p-gal ACTIVITY

Cells of the *Salmonella* strain YSI455 harboring the p-gal-Pgal expression plasmid, a GFP expression plasmid (pGFP) from BIC101 (Yugen, California), which contains the pGFP11 BFP coding sequence under the control of the arabinose promoter, or both expression plasmids were ligated into a supply into a 100 ml flask. After 48 hr of infection, bacteria were harvested and bacteria were isolated to allow detection of the presence of plasmids for p-gal-Pgal and GFP did not correlate with the ability of these bacteria to infect humans. In addition, the target and liver homogenates were used to measure p-gal activity in humans: whether active p-gal could be measured in vivo and whether the p-gal promoter was induced in an appropriate human environment. The results shown in FIG. 11B, indicate very high levels of p-gal promoter activity in the human environment. There is no significant increase in liver expression of p-gal over the background level, which is thought to arise from the low activity of the p-gal promoter in the healthy liver environment and/or the low targeting of the bacterial vector to the liver.

12. EXAMPLES: TETRACYCLINE-INDUCIBLE EXPRESSION AND TITRE

This example demonstrates the expression of a nucleic acid molecule encoding a reporter gene such as p-gal under the control of the tet promoter in an attenuated human-restricted bacterium such as *Salmonella*.

The tet promoter was cloned from a pTet-1010 plasmid using PCR.

amp^r colonies using the following primers:
Forward: 5'-GGA TCC TTA AGA CCC ACT TGC ACA TTT AAG TTT (SEQ ID NO:17)
Reverse: 5'-GCT TCC ATG GTC CAC TTT TCT CCA TCA CTA (SEQ ID NO:18)

- 61 -

Copyright © 2005 by John Wiley & Sons, Inc.

2

10

The following example demonstrates the generation of enhancer-expressing viruses and tumor-targeted Jeddus, and the *in vivo* efficacy of tumor treatment by such

Enzymatic and PCR amplification from a human placental DNA library using the

25 <https://doi.org/10.1002/anie.201910000>

Forward, 5'-GTC

Reverse 5'-ACA CGA GCT CCT ACT TGG AGG CAG TCA TGA AGCT-3' (SRQ ID: 20020)

The resulting PCR product was cloned into the PCR2.1 vector (Invitrogen).
30 Cloning efficiency was PCR amplified using the above constructed plasmid as a

Journal of Management Inquiry 22(1) 3-14
© The Author(s) 2013
Reprints and permissions: sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1056492613505501
<http://jmi.sagepub.com>

Formed: 5'-GGTCC ATG GCT CGC CCG GCA AGT GTC GGC ACT CAC CAT
CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC CAC CGC GAC TGC-3' (80 to 1021)

36 Reverse 5'-GTG CCG ATC CCG ACT TGG AAG CAG TCA TGA AAG TG-3' (SEQ ID NO:27)

The conditions for the PCR amplification consisted of 1 cycle of 93°C 5 min; 36

David J. Hall, PhD, is an associate professor of psychology at the University of North Carolina at Charlotte.

The PCR product was digested with *NheI* and *BamHI* and the 550 bp product was gel isolated and ligated into the pET29A vector that had been previously cut with the same enzymes. The ligation reaction products were transformed into *E. coli* DH5 α and the obtained tumor-derived *Salmonella* strain VNP2012.

The hemolysin- α -endotoxin coding sequence was also cloned into the expression vector YAC33 as a Novobiocin^R Empr^R. YAC334 is the α -glucuronidase PYA272 (Curtis III, U.S. Pat. No. 5,849,453) with the origin of replication from that of the ColE1 (Bacterial and Molecular, 1970, Biotecum 9109-075). Plasmid DNA prepared from positive clones was digested and transformed into the *Salmonella* strain 3324, which is Δ trpD1109 with no mutation. This strain was generated according to the methods described in Curtis III (U.S. Patent No. 5,849,453).

13.2. IN *vt7a0* EXPRESSION OF ENDOSTATIN BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED SALMONELLA

Different strains of *Salmonella* VNT39009 and *E. coli* DH5 α strains containing the

1970s, polyvinylchloride (PVC) was the most common plastic used in building construction (OJD, n.d.). PVC is a white, plastic resin which, when soft, can be easily moulded into 1/2 in. (12.7 mm) IFTOs for fire-fighting. PVC is used for many other applications and is one of the most commonly used plastics. PVC is a thermoplastic, which means that it can be melted and reformed. PVC is a synthetic material, which means that it is made from chemical compounds. PVC is a durable material, which means that it can withstand a wide range of environmental conditions. PVC is a versatile material, which means that it can be used in a wide range of applications. PVC is a popular material, which means that it is widely used in many different industries. PVC is a safe material, which means that it does not contain any harmful chemicals. PVC is a sustainable material, which means that it can be recycled and reused. PVC is a cost-effective material, which means that it is a good choice for many different applications. PVC is a reliable material, which means that it can be trusted to perform well in many different environments. PVC is a long-lasting material, which means that it can be used for many years. PVC is a high-quality material, which means that it is a good choice for many different applications. PVC is a popular material, which means that it is widely used in many different industries. PVC is a safe material, which means that it does not contain any harmful chemicals. PVC is a sustainable material, which means that it can be recycled and reused. PVC is a cost-effective material, which means that it is a good choice for many different applications. PVC is a reliable material, which means that it can be trusted to perform well in many different environments. PVC is a long-lasting material, which means that it can be used for many years. PVC is a high-quality material, which means that it is a good choice for many different applications.

The hexokinase-*glucose-6-phosphate* protein was simply expressed from the YAC336 plasmid, which utilizes the *trc* promoter to direct expression. A protein of the predicted mass of 25 kDa was detected using the anti-hexokinase antibody, as shown in FIG. 16. In FIG. 16, all bacterial cultures from which the samples were harvested had been induced with 0.1 mM IPTG for three hours.

W0100309

PCT/JP2003/021292

13.3. EFFICACY OF ANTITUMOR TUMOR-TARGETED SALMONELLA EXPRESSING CYP200A1 ON CYTARABINE-RESISTANT CARCINOMA

- Colony 38 mouse diagnosed of 2d2d2 mouse with implanted subcutaneously in 5 week old female C57BL/6 mice. When the tumor volume reached 1000 mm³, they were removed, cut into fragments of 2d2d2 mm³. The fragments were serially passaged for 5 times and the resulting 2d2d2 mm³ fragments were implanted subcutaneously at the right flank of female C57BL/6 mice. When tumor volume reached 1200 mm³, approximately 24-26 days after implantation, the mice were randomized into two groups of two mice and each group received a different treatment. One control group received 0.2ml of PBS. Another control group received 0.2 ml containing 1x10⁶ c.f.u. of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* VNF2009 carrying a control plasmid, i.e. no cat plasmid (data not shown, as described in Section 3.6, supra). The first experimental group received 0.2 ml containing 1x10⁶ c.f.u. of VNF2009 expressing a Lactococcus-mediated fusion protein in an cat plasmid. The second experimental group received VNF2009 with the same expression construct as the first group and further expressed BRP.
- FIG. 17 shows the results of these experiments, which demonstrate the efficacy of tumor inhibition by the VNF2009 strains expressing lactococcus-mediated. After 60 days of treatment, the median tumor size in these VNF2009 *Salmonella* expressing endonuclease was approximately 13% of the median tumor size in control animals, and tumor volume was approximately 10% of the median tumor size in control animals, and tumor volume was approximately 10% of the median tumor size in control animals.
- 20 20% less than the median tumor size in control animals, and tumor volume was approximately 10% of the median tumor size in control animals, and tumor volume was approximately 10% of the median tumor size in control animals.
- 25 18(17-20%) finding that endonuclease accounts for tumor volume. The delivery system for endonuclease is enhanced by the secretion of BRP. BRP expression is controlled by the control promoter, which normally shows an SOS response in bacteria. BRP expression was shown to decrease mean tumor volume by approximately 6% of the mean tumor volume of the control population. Furthermore, viability for tumor persistence showed that
- 30 18(17-20%) endonuclease and BRP, control of the rate of tumor volume reduction in tumor volume over time, whereas the tumor volume increased to approximately 10% of the control tumor volume. The effect of BRP is likely to be two-fold. First, BRP may promote tumor necrosis activity, and second, BRP promotes the release of pro-apoptotic endonuclease to tumor cells, which promotes the release of pro-apoptotic endonuclease, which promotes the release of pro-apoptotic endonuclease.

© 2004 Blackwell Publishing Ltd

3

142

39

250

35

307

307

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

• 35 •

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

Keywords: *workplace spirituality, organizational commitment, organizational trust, organizational identification, organizational citizenship behaviors*

A fragment of the correct size was obtained by PCR using pUC19 as template. The PCR product was cut with *SpeI*/BamHI and ligated to the *SpeI*/BamHI restricted vector pTet241 containing the modified ompA signal sequence to produce the plasmid pTet261-Agona. When processed, the sequence produces the Agona green variable.

164. ANTI-ANGIOGENIC PEPTIDES PRODUCED BY *SALMONELLA* INHIBIT ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION[illegible]

The preliminary results in FIOS 19 and 20 showed that the phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced, the thrombopoietin peptide 23-40 (13,40-35) and endotoxin produced by *Salmonella* tend to have anti-coagulating activities between 40-100%.

13. **EXAMPLE: EXPRESSION OF A BACTERIOCIDIN FAMILY MEMBER BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED *SALMONELLA***

This example also contrasts that attenuated *harmobacter* bacteria, such as *S. typhimurium*, containing a nucleic acid encoding a bacteriophage family member are capable of expressing the bacteriophage family member.

13.1. CONSTRUCTION OF COLLISIONS

The plasmids described herein serve to illustrate examples of specific nucleotide sequences of the invention. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, numerous other effector molecule-encoding nucleic acids such as the ribonuclease inhibitor nucleic acid encoding nucleic acids may be created with other appropriate promoters or effector molecule(s) by one skilled in the art.

doi:10.1017/S0007122612000091

[illegible]

The sensitive virus strains (EUS232) grown on an OGE medium. One hundred µl of *Isomacris* infected by 1 ml of a 0.5-10% EUS232 OGE culture (for a 1:100 dilution) and quickly poured between 2 Lilliput plates. The plates are incubated to spread the virus evenly over the plate and 10 min allowed to solidify, the 10-15 minutes. Cultures of 22 ml of *Isomacris* (the virus) activity range is detected are isolated with sensitive toothpick and "rubber" (from 50 µl). The 24-hour plates are then inverted and incubated at 50°C overnight. The following day a link establishing zone appears around the EUS232 on the selected OGE232 kills the sensitive strains. The colonies can be further isolated to isolate EUS production or secondary by treatment with any of a variety of 20-40 µl washing agent such as an ethylalcohol agent (e.g., methanol, water, 10% HCl or X-ray).

The results of one of the lab assays are shown in FIG. 25. When a bacterial strain secretes a collagenase, the presence of a sensitive strain grown on a bacterial lawn on a petri dish, the secreted collagenase kills one such fully susceptible cell; collagenase is the enzyme

PCVAT584112243

5

50

50

19

20

✕

22

30

30 To detect all four *hmr* genes we used PCR on 50 colonies were picked for analysis by nested PCR and for colicin production. All four pure cultures of colonies similar to 41.2.9 were obtained from all four fermentations. Five colonies were picked from each for colicin and PCR analysis. An additional 50 colonies were picked from the 41.2.9 E3 and 1.918 for further analysis as these occurred to be a mixed population of colicin producers.

35 100 colonies from 41.2.918 were picked and over were picked and tested for colicin production.

Table 3

Tissue	CPUGs	Time to melt	CPUGs	number of positive for meltin	% positive in melt PCR	% phenol removal
41.29L	1.26E+03	1.33	4.02E+05	6/5	100%	nil
41.29T	1.26E+03	0.26	2.42E+05	6/5	100%	nil
41.29BL	1.15E+04	2.34	2.46E+04	8/15	100%	64.44
41.292CT	1.05E+05	0.33	1.05E+07	134/135	100%	99.26

13 In order for the call to be placed to have an effect in fact, and in order for it to carry other persons to the site of the same in fact, the call should must be effectively received in fact. The results obtained in this experiment were surprising and also rather dangerous since the target of the officer is the person, and therefore there would be any effect on the lives of the

17. EXAMPLE: TUMOR TARGETING OF
VARIOUS 4129 STRAINS IN
THE 127 LUNG TUMOR MODEL.

The following experiments demonstrate that the ability of 4.1, 2.9 and 4.1 & 2.9 coexpressing cells to form aggregates is dependent on the presence of the 2.9 gene product. The Solonmure strains listed in Table 4 (group 7) were generated by M707 gene processing and are listed in Table 4 (group 7). Organisms that were generated the next day for calculation of their χ^2 values were designated and placed on media to determine the colony forming units (CFU). In groups 1, 2, 4, 6, and 7, the CFU are accounted for in the factors to approximate χ^2 values with varying accuracy in the factors ranging from 10 to 100 CFU. Table 4 summarizes the data for all groups and is represented by the following table. All strains were found to have given the same approximate CFU values. The data may not be accurate due to the fact that the CFU values were not counted and the best value was used for all other strains available.

ACKNOWLEDGMENTS

10/20/2014

Group	Strain	Turnover (T) ($\mu\text{mol/g}$)	critical Stress (kg/cm^2)	Ratio (Turnover/Stress)
1	41.2.50E3	7	5.3×10^4	131/1
1	41.2.50E3	2	8.9×10^4	
2	41.2.5.53E3	7	6.6×10^4	209/1
2	41.2.5.53E3	2	1.2×10^5	
3	41.2.5.53E3	7	8.9×10^4	50/1
3	41.2.5.53E3	2	3.9×10^5	

[illegible]

18. EXAMPLE: EFFICACY OF GLIXOLES ON CUMULATIVE COXON CARCINOMA

The following example demonstrates the ability of 41.2.9/CrE3 to inhibit the growth of C3E mouse colon carcinomas.

Culter JS minor fragment (22x2x2 cm) was implanted in C5 T8/L5 mice (strain: Age 9 weeks) without anesthesia. A skin tunnel was created to 1.0 cm deep. The quarters were removed from the tissue under sterile conditions and only one fragment (below 2x2 cm² surface area), and repeated above procedure for 5 cycles. The fragments were kept in the subcutaneous cavity in the right flank by using a minor fragment of muscle in the right of mouse inguinal.

Animals were sacrificed on Day 0 of Salmonella administration when mean volume expired (330–370 mm³), PEGS index of 41.2 ± 9.5 and 7.2 ± 0.02 were observed, respectively, and divided in three lots in a final concentration of 2.5 × 10⁸ CFU/ml, respectively. Aliquots of 0.2 ml of bacterial suspension (5.0 × 10⁷ CFU/suspense) were administered intraperitoneally once a day for 10 consecutive days (Day 0). The bacterial suspension was diluted to 1 × 10⁷ CFU/gelatin on plates prior and increased overnight to determine the number of bacterial cells which were administered. The animals were sacrificed every four weeks up to the end of the experiment. Three groups of equal group

(199)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

NO.111007

PCT/JP04001204

(C28B) were detected and processed for determining cell and content of platelet.

Groups:

		Mean
1	Untreated control	1.0
2	41.2.9-CoE3 (1:1000) group	1.0
3	41.2.9-CoE3 (1:1000) group	1.0

The results for the efficacy of 41.2.9-CoE3 on C3H mouse colon carcinoma are shown in FIG. 26. The data demonstrates that mice treated by intraperitoneal injection with VNP20009 (41.2.9) are able to significantly inhibit the growth of C3H mouse colon carcinoma. In addition, when mice were treated with VNP20009 according to the CoE3 protocol, tumor regression (i.e., tumors were smaller at the end of the experiment than at the beginning) was achieved.

35. EXAMPLE: ANTI-TUMOR ACTIVITY OF VNP20009 ON OLETH INJECTION OF COLON CARCINOMA IN MICE

The following example demonstrates the enhanced ability of Subcutaneous VNP20009 (41.2.9) to inhibit the growth of OLETH human colon carcinoma relative to Subcutaneous 41.2.9.

OLETH cells grown in 96 plate were screened by trypsinization, a select wide PEG, and retransferred to 96 plate. Single cell suspension (0.1 ml) were injected into NOD mice (NOD.CD1.100, Age 9 weeks, B6; Charles River) subcutaneously on Day 0 (i.e. 10⁶ cells/mouse) at right flank. Two groups were used in each group, randomized and staged at about 10-15 days after tumor implantation, when tumor size reached 100-150mm³. C3H mouse origin 41.2.9 and 41.2.9-CoE3 were treated every third day. Inocula (41.2.9 and 41.2.9-CoE3) were diluted to 1x10⁶ CFU/ml. A volume of 0.1 ml bacterial suspension (41.2.9-CoE3) were injected intraperitoneally into mice on days indicated. The bacterial suspension was diluted to 1x10⁶ CFU, placed into solutions 100ul on each 96 plate and the plates incubated overnight. The bacterial colonies were counted next day. The bacteria were measured twice per week.

Groups:

		Mean
1	Untreated control (PBS)	1.0
2	41.2.9-CoE3 (1:1000) group	1.0
3	41.2.9-CoE3 (1:1000) group	1.0

The results of the anti-tumor activity of 41.2.9-CoE3 on OLETH human colon carcinoma in mice mice are shown in FIG. 27. The 41.2.9-CoE3 containing 41.2.9 alone

- 92 -

OCTAEDRONS 121

shows reduced activity as compared to state 412.9 (cont.

20. **EXAMPLE: EFFICACY OF 52.9/COLK3 ON B16 MELANOMA IN C57BL/6 MICE**

The following example demonstrates the ability of Saffin with module 41.2.2/Cells to inhibit the growth B16-F10 melanoma.

10-110-110 cells grown in triplicate were recovered by trypsinization, washed with PBS, and inoculated into 5 x 10⁶ 110-110 cells. Single cell suspensions (1 x 10⁶) were labeled from ³H-thymidine (Amersham, 40 Ci/mmol) continuously on Day 0 (1 x 10⁶ cells/ml) at night. Ten animals were used in each group, and sacrificed on day 5, when tumor volume reached 150-200 mm³. Tissue samples of lymphatic nodes (1.25 and 1.25 g) were placed in clean vials, and stored in PBS to a final concentration of 7 x 10⁶ cells/ml, respectively. Aliquots of 0.2 and 0.025 g of lymphatic nodes were administered intravenously into mice in a group initiated on Day 9. The tissue suspension were allowed to settle in 10% CPD, placed on microfuge pins and incubated overnight to determine the number of bacterial cells which were administered. The bacteria were measured by plate count up to the end of the experiment.

Group

		Age
20	1. Unrestricted control	10
	2. 45.29 (1.4/10% excess)	10
	3. 41.29 CoCl ₂ (1.5x10 ⁻² mg/ml)	10

The results of the efficacy of 41.2.9C06.3 on 116 female rats on 11 CS7BL/6 mice are shown in Table 28. The data demonstrate that mice treated by intramuscular injection with 41.2.9.4(1.2.8) are able to significantly inhibit the growth of 116 mice embryos. In addition, rats treated with 41.2.9C06.3 showed a significant decrease in litter size at early time points (prior to day 37) compared to 41.2.9 alone. This finding is very important because results demonstrate there are many readily susceptible to a birth defect (e.g., clefts, abnormal pigmentation and such like on - to - 100%).

21. EXAMPLE: ANTITUMOR EFFICACY OF 4-LOXEC COMBINED WITH 5-FU

The following example demonstrates that the incorporation of BGP and WJ is substantially more effective than the incorporation of BGP alone.

The coexpression of DRP and EG in Schwann cells (Fig. 4) increases the amount of EG secreted from the Schwann cell. If DRP was able to increase the amount of EG secreted from the Schwann cells in vivo then it could be involved in the same

(201)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

10 to 10 days

CYCLOSPORIN

addition, experimental ES vaccines readily available to the tumor cells and thus increase the cytotoxicity to these cells. In this experiment, 6 groups of animals (6 animals per group) were used:

Group number	Vaccine
1	Control (no treatment)
2	41.2.5
3	41.2.5/BS
4	41.2.5/BS/BS

The model used in this experiment was the human lung carcinoma line H1975. The cells were implanted into the flank of mice subcutaneously on day 1. When the tumors reached an approximately 300mm³ on day 14 the animals were injected by intravenous injection with 10⁶ cells of the virus described in the above table, or with saline in the control group. The tumor volume was measured weekly up to day 24. The results in Table 5 show that while 41.2.5 by itself is able to inhibit tumor growth (40% inhibition), the combination with BS is able to increase the anti-tumor efficacy (53%). However, when the virus carrying both ES and BS is used in this model, the anti-tumor efficacy is further enhanced (77% inhibition compared to untreated control) and the enhanced inhibition is also significant at the earlier time points (Table 5).

Table 5: Percent Tumor Growth Inhibition Compared to Untreated Control

Group	Day 17	Day 20	Day 24
41.2.5	50	40	40
41.2.5/BS	68	58	65
41.2.5/BS/BS	77	82	82

In conclusion, treatment with Adenovirus carrying both the cytotoxic protein ES and the enhanced cytotoxic protein BS results in an increase in anti-tumor efficacy compared to the untreated control and to treatment with 41.2.5/BS alone.

21. EXAMPLE: COMBINATION OF CYCLOSPORIN ES-CARRYING SALMONELLA WITH X-RAY IRRADIATION

The following example demonstrates that the combination of 41.2.5 with the dose of X-ray significantly increases the survival time of mice above that seen for X-ray alone.

The schedule was as follows: At day 0, tumors were implanted by the subcutaneous injection of 10⁶ cells of the tumor cells (i.e. in the right side, at mid body of the C57BL/6 mice) into 5-7 week old mice. At day 5, either ES-carrying Adenovirus 41.2.5 was injected into the mice, and 25% of mice were sacrificed.

— 96 —

CC BY-NC-ND 4.0

Table 6

Category	n (=)	Days to LG	mean	SD
A alone 12Gy	(6)	12, 15, 16, 18, 21	17	1.0
A + 15Gy 3-mys 12Gy, 26dpt	(9)	14, 14, 15, 21, 25, 35, 37, 37	23	1.9
K 41.2.9+15Gy A+regul 12Gy, 26dpt regression #1, 2	(7)	21, 23, 35, 35, 38, 68, 68, 67	47	2.8
L 41.2.9/50+15Gy 3-mys 12Gy, 26dpt regression #1, 2	(9)	28, 39, 43, 56, 56, 48, 62, 74, 76	57	3.3

29 21. EXAMPLE: EXPRESSION OF CYTOTOXIC MICROSOMAL
FACTORS BY TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates that the expression of *E. coli* cytosolic secretory factor 1 (CSF1) by source-tagged bacteria.

[illegible]

36 CNF1 was cloned from *cat* 356 (ATCC 700616) by PCR using two primers (forward) 5'-GTGTCATGAAAATGGGTAAGCAATGCGAAC-3' (35Q ID NO.35) and (reverse) 5'-CACAGACGCTTCCCTGATCAACAAACACACAGGAGG-3' (35Q ID NO.36) using standard PCR. An approximately 3700 bp product was obtained and stored into the Hind and Sma sites of pTZ19 as representative of the plasmids as well as DNA sequencing using *E. coli* as the DNA cloning host. DNA sequencing was performed by standard methods at the Yale University School of Microbiology laboratory. The DNA

The CNF1 plasmid was constructed into an *E. coli* CNF1 cloning host (Gibco and Jahnke) using pUC194 (Genoscreen Publications No. WG 971303). The expression of CNF1 was determined for the *E. coli* CNF1 plasmid host (Gibco and Jahnke) using a modified Lys entry (Pharmacia, Madison, WI, Catalog No. 649). FIG. 2 shows that the presence of the CNF-encoding plasmid results in enhanced cytotoxicity.

A control assay was used to show that *Salmonella* carrying the CNF-encoding plasmid also exhibits other known properties of CNF1 such as antiadhesins (Gibco et al., 1992, 2001; Jahnke, 2001; Gibco, 2001). Bacteria exposed to CNF1 were examined for adhesion by light microscopy. The results in FIG. 3 clearly show that the presence of CNF1 in *Salmonella* results in an up-regulated mucinase and cell adhesion.

Venecious was cloned from *2.0 kb* BAC16(ATCC 53227) using primers based upon the published sequence for venecious and confirmed by DNA sequencing at the Yale Kohn Biotechnology Center using standard DNA sequencing techniques. The expression of venecious was accomplished using the DFR gene under control of the tetracycline-inducible promoter polyclonal with the venecious A and B subunits. This tetracycline-inducible RFP-venecious AB was cloned into a vector for chromosomal integration using the *oriT* gene.

H19B/7: forward 5'-GTGTCATGGCTAAACATTAATAAGTTCATC-3'
(SEQ ID NO:37) and

(204)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

NO-NUC) (CYCLOCOPOLYMER)
 Q375: this inverse 5'-ATTGTCGCAAGTGAATGAGATG-3' (SEQ ID NO 38)

These plasmids also contain under Bam(1) and Pst(2) restriction sites for cloning into the Hind and Pst sites of pCR9.6.

34.1.3. GENE CLONING AND CLONING OF TETR
 The TETR-AB was constructed in the lacZ vector pTZ19-996. TETR-AB was generated by PCR using the following primers: TetrA: forward 5'-GTGTAGATCTTTAAGACCACTTCACATTAAAGTCT-3' (SEQ ID NO 39) and TETR-TET-P: reverse 5'-GACAGGATCTTACTAAGCCGCACTCCCG-3' (SEQ ID NO 40). These primers contain Bam(1) and Pst(2) restriction sites for cloning into Pst and Bam sites of pTZ19-996 vector.

34.1.4. GENE CLONING OF AN INTO pTZ19-996 TETR
 pTZ19-996 was digested with Bam(1) and Pst(2) restriction endonucleases to remove the lacZ gene from pTZ19-996-TETR, also digested with Bam(1) and Pst(2) restriction endonucleases. The pTZ19-996-TETR vector contains multiple restriction sites for cloning into a portion of the lacZ gene for lacZ-allele complementation in trans. Recombinant vector (pTZ19-996-TETR) and the AD vector were mixed on a 0.8% A/G agarose gel and purified using the Qiagen gel extraction kit. The vector and insert were ligated using T4 ligase and transformed into DH5a cells using the heat shock method. The cells were plated on LB plates containing 100 µg/ml Amp and 40 µg/ml X-gal. Positive colonies were selected based on ampicillin resistance and the presence of a functional lacZ gene (purple colonies were blue).

34.1.5. GENE CLONING OF TETR-AD INTO pTZ19-996
 pTZ19-996-TETR-AD was digested with Bam(1) and Pst(2) restriction endonucleases to remove the lacZ gene from pTZ19-996-TETR, also digested with Bam(1) and Pst(2) restriction endonucleases.

34.1.6. GENE CLONING OF TETR-AD INTO pTZ19-996
 A vector capable of undergoing homologous recombination with the DnaB gene in the chromosome of male YNP2009 (pila Y3146) in *Escherichia coli* YNP2009 (pila Y3146) was constructed in the vector pTZ19-996 (Dowling and Kaper, 1991). Infection and lysis of YNP2009 (pila Y3146) with the DnaB gene (pTZ19-996-TETR-AD) was performed using the DnaB gene (pTZ19-996-TETR-AD) and the DnaB gene (pTZ19-996-TETR-AD) in two separate reactions (pTZ19-996-TETR-AD and pTZ19-996-TETR-AD).

• 99 •

(205)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

000 TTA ACC CTC TGA GAT (BRQ) (B) (N) (4) and reverse: 3' GTC TGC ATG CGG
 000 DCC ATG TAC GCG GCG GAT TTA AAT GCG AAC GTC CGT CGA AAC GCG
 040 DCA G-3' (BRQ) (B) (N) (4) and read 3' forward: 3' CTC TGC ATG CGG GGT
 TAA TTA ACG GCG CGG CGG GGT GAT AAT GAT TGA ACC GAG GGT GAT CAT
 040 ATG GCG 3' (BRQ) (B) (N) (4) and reverse: 3' ATG TCT CGA CGA TAT CAT TCT
 5 GGC CTC TGA GGT TGT G-3' (BRQ) (B) (N) (4). These primers also contain more fast
 (5') and slow (3') sequences within the 1000 bp distance chosen from the end of full
 size of pCYD42 when these two fragments are joined in a construct. 394 bp and
 generate (insert) MspI, PstI, SphI, BstI, and NotI. In order to facilitate cloning of DNA
 fragments into the DnaBII for stable chromosomal integration with an antibiotic resistance
 10 (R⁺) gene, this vector is subcloned into pCYD42 (see FIGS. 22 and 23).
 In order to clone the Tn-DRP-AB into the pCYD42-*cat*, the Tn-DRP-AB
 plasmid DNA was restriction digested and the appropriate DNA, separated and ligated
 reaction containing these two components was performed using T4 ligase. The ligase
 reaction mixture was transformed to *Escherichia coli* cells and screened for the presence and
 15 integration of the Tn-DRP-AB. The Tn-DRP-AB clones was transformed into the strain
 39401 (p) (Dowling and Hayes, 1991) and screened for the presence of pCYD42-
 Tn-DRP-AB. Colonies of 39401 (p) were screened for the Tn-DRP-AB gene by PCR, and in
 39401 (p) clones pCYD42- Tn-DRP-AB was shown to be in a reading frame to
 subsequence analysis. 39401 (p) containing the pCYD42- Tn-DRP-AB was used to
 20 transform strain Y5504 (a spontaneous derivative of the protoplast-transformed strain
 Y502 (Law et al., 1992) and with antibiotic resistance to D-threo MacCorden 800) by
 standard methods (Davis, K. W., Smith, D., and Roth, J. N. 1990. *Antibiotic Resistance*
 Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor) and screened for col-
 onies containing D-threo, tetracycline (with) and XOP (with) resistance (cat). The
 25 resulting Y5504-*pCYD42- Tn-DRP-AB* clones were checked for pCYD42- Tn-DRP-
 AB gene by PCR.

24.3. TRANSFER OF THE CHROMOSOMALLY INTEGRATED pCYD42-*Tn-DRP-AB* INTO 41.29 (Y5504) TO GENERATE THE STRAIN 41.29-Tn-DRP-AB

30 Using horizontal gene transfer (HGT) (see 39401, Davis et al., 1992), 41.29 was
 transferred to the *Escherichia coli* strain Y5504-*Tn-DRP-AB* clones. The
 presence of the *cat* gene in 41.29-*pCYD42- Tn-DRP-AB* which contained both the *DnaBII*
 and *DnaBII- Tn-DRP-AB* genes (FIG. 33, 34). Strain 41.29-*Tn-DRP-AB* was placed
 35 in 100 µl of 10% glycerol derivative to generate the *DnaBII* gene and then the
DnaBII- Tn-DRP-AB gene according to the methods of Doolittle and Soper, 1999.

+ 25 +

BY VATHINEN ET AL.

41.29-Test BTP-1-vaccines AD was tested for cytotoxicity in a standard L₉₂₉ cytotoxicity assay (CytoTox[®]; Promega, Madison, Wisconsin). The results are shown in FIG. 34, demonstrating the toxic properties of vaccine-inactivating doses 26 and 31. Clones 26 and 31 are a significantly higher percentage of the mean value tested with non-toxic clones when not treated with toxicology.

The following example demonstrates that item-impacted behavior can be expressed as a function of the item variables such as item difficulty, item discrimination, and item index for the control.

[illegible]

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/ticontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

(210)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W0302280

CYC00000001

pheral/Mb of size, propagated with internal, recombined to water and subjected to restriction digestion with *Hpa*I and *Bln*I. The restriction-digested PCR product was separated by gel electrophoresis in order to obtain the correct size (approximately 420 bp) for the TAT-aptamer and lac-tet-lacZ-TAT-aptamer, respectively) were isolated from the gel and isolated using standard molecular biology techniques. These products are ligated into *Nco*I and *Bln*I III dependent vectors (Pharmacia) and result in the pTAT-TAT-aptamer construct. The correct DNA sequence was obtained for both the TAT-aptamer (FIG. 37) and the lac-tet-lacZ-TAT-aptamer (FIG. 38).

17.3. DEMONSTRATION OF SECRETION AND UPTAKE OF TAT-APOTOM

10 Anticancer tumor-targeted bacteria are constructed with the pTAT-TAT-aptamer sequence by standard techniques known in the art (e.g., by standard or electroporation) and cultured in media. The supernatant from the bacterial culture is tested for the presence of TAT-aptamer using techniques known to those of skill in the art (e.g., Western blot analysis or ELISA). Once the presence of the TAT-aptamer in the supernatant of the bacterial culture is confirmed, the bacterial culture supernatant is combined with mammalian cells (e.g., NIH3T3, CHO, 293, and 3021 cells) and the presence of the TAT-aptamer binds the cells is confirmed by specific assays known to those of skill in the art.

17.3. DEMONSTRATION FOR UPTAKE OF TAT-APOTOM IN MAMMARY GLANDS

20 Anticancer tumor-on gene/bacterial aptamer and/or specific TAT-aptamer or aptamer after administration of the bacteria and/or organ weights are determined. Mice are weighed for the presence and localization of TAT-aptamer or aptamer using specific assays (e.g., DNA, histology and fluorescence in situ cell death detection kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) known to those of skill in the art. Further, the size of the tumor is also weighed to determine anti-tumor activity of the TAT-aptamer. Tumors are also homogenized and placed to determine the colony forming units (c.f.u.).

20 18. EXAMPLE: EFFICACY OF THE COMBINATION OF VITAMIN AND CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ON THE GROWTH OF MMTV TUMOR-ASSOCIATED TUMORS

The following example demonstrates that the administration of tumor-targeted bacteria is combinable with a chemotherapeutic agent may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors such as lung carcinoma.

• 802 •

(711)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 02/289

CCTC86-0004

20.3. EFFICACY OF THE COMBINATION OF VINCERMIN
AND CYTOSIN ON VNP74209 AND METOPROLOL C-OP
THE 6-KETOGLUTAMATE CARBOXYMETHYL ESTER.

- 10 Lymphocytes from M27 murine lung carcinoma cells (1×10^6) cells were
removed by rapidly washing the cells at 37°C and cultured with 10 ul of DMEM culture
medium containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C , 5% CO_2 . After passing the cells
for two generations, M27 cells in log phase were removed by trypsinization, washed with 1
4 PBS, and resuspended in 2.5 ml of distilled water with 1 x PBS for intraperitoneal injection. For M27
cell suspension was implanted into 100 C57BL/6 mice (female, aged 8 weeks, 20 g, 1 x 10⁶
cells/mouse) subcutaneously on the right flank on Day 0. The mice were randomly divided
into two groups with each group consisting of 10 mice.
- 10 Salivette strain VNP74209 was diluted to 5×10^7 CFU/ml with 1 x PBS with per
standard dilution procedure. Each mouse was intraperitoneally administered 0.2 ml of diluted
Salivette (1×10^7 CFU/mouse) on day 12 according to Table 6, infra. In order to
determine day 12 survival number of infected bacteria, the 5×10^7 CFU/ml bacterial suspension
was further diluted to 1×10^7 CFU/ml and plated on petri-dish agar (200 ul plate).
- 15 Intraperitoneal Pankherson No. WO 99/10523). The colonies formed were counted the next
day.

- The antineoplastic C (Sigma) and cytosine (Sigma) were administered to mice
according to Table 7, infra. The control dose of cytosine C was given to the control group
prior to day 12 but not those treated with cytosine C only due to the large size of the
mouse. 500 mg of Cytosine (Sigma), West Haven, CT) was administered to each mouse
treated with VNP74209 alone or VNP74209 + chemotherapeutic drugs since severe toxic
reactions were observed in groups treated with VNP74209 + cytosine. The tumor volume
was measured twice a week until the end of the experiment. The behavior, appearance and
mortality of the animals were observed daily. The mice were kept in a clean, temperature-
controlled laboratory. The bedding was changed twice a week and the mice were provided
with enough food and drinking water.

Table 7

Group	Number of Mice
No treatment control	10
3 mg/kg metoprolol C, i.v., day 15	10
2 mg/kg vincristine C, i.v., day 15	10
100 mg/kg cytosine, i.p., day 15	10
200 mg/kg cytosine, i.p., day 15	10
VNP74209, 1×10^7 cells i.v., day 12	10

- 104 -

(212)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

WD number	Group	Number of Mice
	VNP2000, 1x10 ⁶ tumor i.v., day 10 + 3 mg/ml cyclophosphamide C, i.v., days 13 & 22	10
	VNP2000, 1x10 ⁶ tumor i.v., day 12 + 3 mg/ml cyclophosphamide C, i.v., days 15 & 22	10
5	VNP2000, 1x10 ⁶ tumor i.v., day 12 + 250 mg/ml cyclophosphamide C, i.v., day 15	10
	VNP2000, 1x10 ⁶ tumor i.v., day 12 + 250 mg/ml cyclophosphamide C, i.v., day 15	10

- 10 At about day 10, by the combination treatment with VNP2000 + cyclophosphamide the growth of the M27 lung carcinoma was inhibited more than VNP2000 treatment alone or cyclophosphamide alone. As shown in FIG. 4B, the combination of VNP2000 + cyclophosphamide C inhibited the growth of the M27 lung carcinoma more than cyclophosphamide C alone. However, the combination of VNP2000 + cyclophosphamide C did not inhibit the growth of the M27 lung carcinoma more than VNP2000 treatment alone (FIG. 4B). These results suggest that the administration of attenuated cancer-caused bacteria in combination with a chemotherapeutic agent may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors within lung carcinoma.

- 20 28.2. EFFICACY OF THE COMBINATION OF VNP2000 AND CYCLOPHOSPHAMIDE ON THE GROWTH OF M27 LUNG CARCINOMA IN MICE
- Liquid images of M27 murine lung carcinoma cells (1.5x10⁶/ml x 1ml) were injected by catheter through the tail at 37°C and evaluated with 25 ml of DMSO solution medium containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C, 10% CO₂. After passing the cells for two generations, M27 cells in logarithmic phase (90-95% confluence) were removed by trypsinization, washed with 1 x PBS, and resuspended to 2.5x10⁶ cells/ml with 1 x PBS for tumor implantation. An M27 cell suspension (0.2 ml) was implanted into SC57BL/6 mice (female, aged 8 weeks, 20 g; 2x10⁶ cells/mouse) subcutaneously at the right flank on day 0.
- 30 The mice were randomly divided into groups with each group consisting of 9 mice. Subcutaneous VNP2000 was diluted to 1x10⁶ CFU/ml with 1 x PBS with our standard dilution procedure. Each mouse was administered via the tail with 0.2 ml of Salivarin (1x10⁶ CFU/mouse) on day 12 according to Table 2, right. In order to determine the actual number of injected bacteria, the 2x10⁶ CFU/ml bacterial suspension was further diluted to 1x10⁶ CFU/ml and plated on M27 plates. The colonies formed were counted the next day.

- 301 -

(213)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

Information

Experimental

The elaphe was subjected to nine on day 14, two days post bacterial injection (Table 8, left). The elaphe was divided as 0.5 mg/ml with current white pine in administration. The mean volume was measured twice a week until the end of the experiment. The behavior, appearance and mortality of the animals was observed daily. The mice were kept in a clean, temperature controlled laboratory. The bedding was changed twice a week and the mice were provided with enough food and drinking water.

Table 8

Group	Number of mice
Control (no treatment)	9
VNP20009, 1x10 ⁸ CFU/ml i.v., on day 12	9
9 mg/kg elaphe, i.p. on a 2, on day 14, 15	9
VNP20009, 1x10 ⁸ CFU/ml i.v., on day 12 + 9 mg/kg elaphe, i.p. on a 2, on day 14, 15	9

As shown in FIG. 4L, the control group injected with VNP20009 + elaphe did not show the growth of the 1027 mg elaphe as we did VNP20009 treatment alone or elaphe treatment alone. These results suggest that the administration of repeated doses of elaphe in combination with VNP20009 agent with elaphe may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors as a long-term effect.

The present invention is not to be limited in scope by the specific methods and materials described herein. Indeed, various modifications of the invention in which the described features are incorporated as described herein are intended to be included in the scope of the present invention. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

Various substitutions are used herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entirety.

* 105 *

PROSTATE

WHAT IS CLAIMED IS:

- 167 -

Seitendruck

BY STATEMENT OF

8. The structured seven-tuplet barcode of June 7, wherein the barcode family members in ColG1, ColG2, ColG3, ColG4, ColG5, ColG6, ColG7, ColG8, ColG9, ColG10, ColG11, ColG12, ColG13, ColG14, ColG15, ColG16, ColG17, ColG18, ColG19, ColG20, ColG21, ColG22, ColG23, ColG24, ColG25, ColG26, ColG27, ColG28, ColG29, ColG30, ColG31, ColG32, ColG33, ColG34, ColG35, ColG36, ColG37, ColG38, ColG39, ColG40, ColG41, ColG42, ColG43, ColG44, ColG45, ColG46, ColG47, ColG48, ColG49, ColG50, ColG51, ColG52, ColG53, ColG54, ColG55, ColG56, ColG57, ColG58, ColG59, ColG60, ColG61, ColG62, ColG63, ColG64, ColG65, ColG66, ColG67, ColG68, ColG69, ColG70, ColG71, ColG72, ColG73, ColG74, ColG75, ColG76, ColG77, ColG78, ColG79, ColG80, ColG81, ColG82, ColG83, ColG84, ColG85, ColG86, ColG87, ColG88, ColG89, ColG90, ColG91, ColG92, ColG93, ColG94, ColG95, ColG96, ColG97, ColG98, ColG99, ColG100, ColG101, ColG102, ColG103, ColG104, ColG105, ColG106, ColG107, ColG108, ColG109, ColG110, ColG111, ColG112, ColG113, ColG114, ColG115, ColG116, ColG117, ColG118, ColG119, ColG120, ColG121, ColG122, ColG123, ColG124, ColG125, ColG126, ColG127, ColG128, ColG129, ColG130, ColG131, ColG132, ColG133, ColG134, ColG135, ColG136, ColG137, ColG138, ColG139, ColG140, ColG141, ColG142, ColG143, ColG144, ColG145, ColG146, ColG147, ColG148, ColG149, ColG150, ColG151, ColG152, ColG153, ColG154, ColG155, ColG156, ColG157, ColG158, ColG159, ColG160, ColG161, ColG162, ColG163, ColG164, ColG165, ColG166, ColG167, ColG168, ColG169, ColG170, ColG171, ColG172, ColG173, ColG174, ColG175, ColG176, ColG177, ColG178, ColG179, ColG180, ColG181, ColG182, ColG183, ColG184, ColG185, ColG186, ColG187, ColG188, ColG189, ColG190, ColG191, ColG192, ColG193, ColG194, ColG195, ColG196, ColG197, ColG198, ColG199, ColG200, ColG201, ColG202, ColG203, ColG204, ColG205, ColG206, ColG207, ColG208, ColG209, ColG210, ColG211, ColG212, ColG213, ColG214, ColG215, ColG216, ColG217, ColG218, ColG219, ColG220, ColG221, ColG222, ColG223, ColG224, ColG225, ColG226, ColG227, ColG228, ColG229, ColG230, ColG231, ColG232, ColG233, ColG234, ColG235, ColG236, ColG237, ColG238, ColG239, ColG240, ColG241, ColG242, ColG243, ColG244, ColG245, ColG246, ColG247, ColG248, ColG249, ColG250, ColG251, ColG252, ColG253, ColG254, ColG255, ColG256, ColG257, ColG258, ColG259, ColG260, ColG261, ColG262, ColG263, ColG264, ColG265, ColG266, ColG267, ColG268, ColG269, ColG270, ColG271, ColG272, ColG273, ColG274, ColG275, ColG276, ColG277, ColG278, ColG279, ColG280, ColG281, ColG282, ColG283, ColG284, ColG285, ColG286, ColG287, ColG288, ColG289, ColG290, ColG291, ColG292, ColG293, ColG294, ColG295, ColG296, ColG297, ColG298, ColG299, ColG300, ColG301, ColG302, ColG303, ColG304, ColG305, ColG306, ColG307, ColG308, ColG309, ColG310, ColG311, ColG312, ColG313, ColG314, ColG315, ColG316, ColG317, ColG318, ColG319, ColG320, ColG321, ColG322, ColG323, ColG324, ColG325, ColG326, ColG327, ColG328, ColG329, ColG330, ColG331, ColG332, ColG333, ColG334, ColG335, ColG336, ColG337, ColG338, ColG339, ColG340, ColG341, ColG342, ColG343, ColG344, ColG345, ColG346, ColG347, ColG348, ColG349, ColG350, ColG351, ColG352, ColG353, ColG354, ColG355, ColG356, ColG357, ColG358, ColG359, ColG360, ColG361, ColG362, ColG363, ColG364, ColG365, ColG366, ColG367, ColG368, ColG369, ColG370, ColG371, ColG372, ColG373, ColG374, ColG375, ColG376, ColG377, ColG378, ColG379, ColG380, ColG381, ColG382, ColG383, ColG384, ColG385, ColG386, ColG387, ColG388, ColG389, ColG390, ColG391, ColG392, ColG393, ColG394, ColG395, ColG396, ColG397, ColG398, ColG399, ColG400, ColG401, ColG402, ColG403, ColG404, ColG405, ColG406, ColG407, ColG408, ColG409, ColG410, ColG411, ColG412, ColG413, ColG414, ColG415, ColG416, ColG417, ColG418, ColG419, ColG420, ColG421, ColG422, ColG423, ColG424, ColG425, ColG426, ColG427, ColG428, ColG429, ColG430, ColG431, ColG432, ColG433, ColG434, ColG435, ColG436, ColG437, ColG438, ColG439, ColG440, ColG441, ColG442, ColG443, ColG444, ColG445, ColG446, ColG447, ColG448, ColG449, ColG450, ColG451, ColG452, ColG453, ColG454, ColG455, ColG456, ColG457, ColG458, ColG459, ColG460, ColG461, ColG462, ColG463, ColG464, ColG465, ColG466, ColG467, ColG468, ColG469, ColG470, ColG471, ColG472, ColG473, ColG474, ColG475, ColG476, ColG477, ColG478, ColG479, ColG480, ColG481, ColG482, ColG483, ColG484, ColG485, ColG486, ColG487, ColG488, ColG489, ColG490, ColG491, ColG492, ColG493, ColG494, ColG495, ColG496, ColG497, ColG498, ColG499, ColG500, ColG501, ColG502, ColG503, ColG504, ColG505, ColG506, ColG507, ColG508, ColG509, ColG510, ColG511, ColG512, ColG513, ColG514, ColG515, ColG516, ColG517, ColG518, ColG519, ColG520, ColG521, ColG522, ColG523, ColG524, ColG525, ColG526, ColG527, ColG528, ColG529, ColG530, ColG531, ColG532, ColG533, ColG534, ColG535, ColG536, ColG537, ColG538, ColG539, ColG540, ColG541, ColG542, ColG543, ColG544, ColG545, ColG546, ColG547, ColG548, ColG549, ColG550, ColG551, ColG552, ColG553, ColG554, ColG555, ColG556, ColG557, ColG558, ColG559, ColG560, ColG561, ColG562, ColG563, ColG564, ColG565, ColG566, ColG567, ColG568, ColG569, ColG570, ColG571, ColG572, ColG573, ColG574, ColG575, ColG576, ColG577, ColG578, ColG579, ColG580, ColG581, ColG582, ColG583, ColG584, ColG585, ColG586, ColG587, ColG588, ColG589, ColG590, ColG591, ColG592, ColG593, ColG594, ColG595, ColG596, ColG597, ColG598, ColG599, ColG600, ColG601, ColG602, ColG603, ColG604, ColG605, ColG606, ColG607, ColG608, ColG609, ColG610, ColG611, ColG612, ColG613, ColG614, ColG615, ColG616, ColG617, ColG618, ColG619, ColG620, ColG621, ColG622, ColG623, ColG624, ColG625, ColG626, ColG627, ColG628, ColG629, ColG630, ColG631, ColG632, ColG633, ColG634, ColG635, ColG636, ColG637, ColG638, ColG639, ColG640, ColG641, ColG642, ColG643, ColG644, ColG645, ColG646, ColG647, ColG648, ColG649, ColG650, ColG651, ColG652, ColG653, ColG654, ColG655, ColG656, ColG657, ColG658, ColG659, ColG660, ColG661, ColG662, ColG663, ColG664, ColG665, ColG666, ColG667, ColG668, ColG669, ColG670, ColG671, ColG672, ColG673, ColG674, ColG675, ColG676, ColG677, ColG678, ColG679, ColG680, ColG681, ColG682, ColG683, ColG684, ColG685, ColG686, ColG687, ColG688, ColG689, ColG690, ColG691, ColG692, ColG693, ColG694, ColG695, ColG696, ColG697,

9. The appellational phrase suggested bacteria of class 1 or 2, wherein the primary effector molecule is a tumor inhibitory enzyme.

(d). This animal used has been reported to contain as large as 9% water in the tumor inhibitory activity by testosterone, progesterone, lipase, phospholipase, protease, Dithionite or glycerol.

11. The assumed target molecule of class 1 or 2, whose the primary effector molecule is histidine, namely, CHN, CH₂N, or UH₂N.

12. The assumed two-targeted kinetics of elute 1 or 2, wherein the primary
10 either molecule is derived from an external plant, bacteria, or virus.

13. The suggested non-targeted locus of claim 2, wherein the secondary effector molecule is a virus particle, an anti-viral protein, a pro-drug or a cell killing agent, an enzyme molecule, a peptide, or a toxin.

14. The asteroform two-targeted barlets of class 1 or 2, where the asteroform two-targeted barlet is 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836,

15. The *apoptosis* name-targeted bacteria of class 1, wherein the *apoptosis* name-targeted bacteria further comprises an *apoptosis* release system.

16. The attempted semi-crystallization of claim 2, wherein the secondary effluent monomer is in a monomeric solution phase (MPS).

17. An attenuated *hsp90*-tagged bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters wherein said attenuated *hsp90*-tagged bacteria is a facultative member of *Streptococcus* and said fusion protein comprises a signal sequence and an effector molecule.

18. An intracellular tumor-infiltrating bacteria encapsulating one or more metabolic active molecules, encoding one or more fusion proteins capable of binding to one or more proteins

- 126 -

(216)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO NUMBER

PCT NUMBER

wherein said attenuated virus-targeted bacteria are a facultative anaerobe or facultative aerobe and said bacterium comprises a flagellar protein and an effector molecule.

19. The attenuated virus-targeted bacteria of claim 18, wherein the bacterium further comprises a signal sequence.
20. The attenuated virus-targeted bacteria of claim 17 or 19, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.
21. The attenuated virus-targeted bacteria of claim 18 or 19, wherein the flagellar protein is derived from the HIV TAT protein, the attenuated is heteromultimeric (heterodimer), basal of filamentous growth factor (PCT) transmembrane-spanning sequence (TMS), is a gene transfer virus (GTV), is a bacteriophage, is a bacteriophage, or a bacteriophage.
22. The attenuated virus-targeted bacteria of claim 17, 18 or 19, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.
23. The attenuated virus-targeted bacteria of claim 17, 18 or 19, wherein the attenuated virus-targeted bacteria further comprises one or more bacteriophage molecules encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.
24. The attenuated virus-targeted bacteria of claim 23, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.
25. A phage or bacteriophage or bacteriophage comprising a phage or bacteriophage operably linked to an attenuated virus-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated virus-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative aerobe.
26. A phage or bacteriophage or bacteriophage comprising a phage or bacteriophage operable nucleic acid or nucleic acid operably linked to one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated virus-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative aerobe.
27. The phage or bacteriophage or bacteriophage of claim 25 or 26, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNS family member.

- 500 -

© 2007 The Authors

5

39

20

2

3

3

POLYMER LETTERS

- 111-

POSTHUMUS

47. The pharmacological composition of claims 41, 42 or 43, wherein the attached tumor-targeted hetero- or further conjugates are or were needed to add stable binding and/or more effective molecules covalently linked to one or more proteins.

46. A method for delivering one or more privacy effector molecules for the treatment of a solid tumor, enter to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising an effector molecule to a subject carrier and no disclosure was suggested because administering one or more nucleic acid antibodies, enter to one or more privacy effector molecules is typically known to one of the art, promoters, vectors and carrier used in a pharmaceutical formulation is a fully disclosed in the literature, enter to one of the art.

49. A method for affecting one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules for the treatment of a solid tumor in or to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmacological composition, a pharmacologically acceptable ester and/or an esterified form of said nucleic acid, or a mixture of one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules optionally linked to one or more promoters, wherein said nucleic acid encodes a tumor suppressor gene, a proapoptotic agent or a proinflammatory agent.

50. The address of vehicle 48 or 49, which is at least one of the primary offense residences is a THF family member.

5L The method of Stein et al., wherein the TNF family member is shown as protein ligand or TNF- α , has been used in the TNF- α , TNF- β and TNF-related receptor ligands (TRAIL), TNF-related membrane-associated receptors (TRANCE), TNF-related inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, HVEM, CD276, CD289, + HVEM, ACHE, LIGHT, VISTA, TRAF6, TRAF3, TRAF1, + AITR-L.

52. The method of claim 45 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules is a non-muscle-specific factor.

[illegible]

PCATWIS

ingens in 24 amino acid fragments of placenta, however, the anti-meningitis factor contained 13-49, the anti-meningitis 23 amino acid peptide fragment of thromboporphin B, the anti-meningitis 20 amino acid peptide fragment of SPANIN-2, 3-D and NGR containing peptides, the 6-epi-meningitis peptide of fibrin, thrombin B, post-MG and DGP, and several antigens of *Neisseria meningitidis*, or YAGP antigen.

24. The method of claim 49 or 49, wherein the level of the primary effector molecule is statistically directly correlated with the growth and therefore is not RPD.
25. The method of claim 24, wherein the bacterial family member is *C02B1*, *C02B2*, *C02B3*, *C02B4*, *C02B5*, *C02B6*, *C02B7*, *C02B8*, *C02B9*, *C02B10*, *C02B11*, *C02B12*, *C02B13*, *C02B14*, *C02B15*, *C02B16*, *C02B17*, *C02B18*, *C02B19*, *C02B20*, *C02B21*, *C02B22*, *C02B23*, *C02B24*, *C02B25*, *C02B26*, *C02B27*, *C02B28*, *C02B29*, *C02B30*, *C02B31*, *C02B32*, *C02B33*, *C02B34*, *C02B35*, *C02B36*, *C02B37*, *C02B38*, *C02B39*, *C02B40*, *C02B41*, *C02B42*, *C02B43*, *C02B44*, *C02B45*, *C02B46*, *C02B47*, *C02B48*, *C02B49*, *C02B50*, *C02B51*, *C02B52*, *C02B53*, *C02B54*, *C02B55*, *C02B56*, *C02B57*, *C02B58*, *C02B59*, *C02B60*, *C02B61*, *C02B62*, *C02B63*, *C02B64*, *C02B65*, *C02B66*, *C02B67*, *C02B68*, *C02B69*, *C02B70*, *C02B71*, *C02B72*, *C02B73*, *C02B74*, *C02B75*, *C02B76*, *C02B77*, *C02B78*, *C02B79*, *C02B80*, *C02B81*, *C02B82*, *C02B83*, *C02B84*, *C02B85*, *C02B86*, *C02B87*, *C02B88*, *C02B89*, *C02B90*, *C02B91*, *C02B92*, *C02B93*, *C02B94*, *C02B95*, *C02B96*, *C02B97*, *C02B98*, *C02B99*, *C02B100*, *C02B101*, *C02B102*, *C02B103*, *C02B104*, *C02B105*, *C02B106*, *C02B107*, *C02B108*, *C02B109*, *C02B110*, *C02B111*, *C02B112*, *C02B113*, *C02B114*, *C02B115*, *C02B116*, *C02B117*, *C02B118*, *C02B119*, *C02B120*, *C02B121*, *C02B122*, *C02B123*, *C02B124*, *C02B125*, *C02B126*, *C02B127*, *C02B128*, *C02B129*, *C02B130*, *C02B131*, *C02B132*, *C02B133*, *C02B134*, *C02B135*, *C02B136*, *C02B137*, *C02B138*, *C02B139*, *C02B140*, *C02B141*, *C02B142*, *C02B143*, *C02B144*, *C02B145*, *C02B146*, *C02B147*, *C02B148*, *C02B149*, *C02B150*, *C02B151*, *C02B152*, *C02B153*, *C02B154*, *C02B155*, *C02B156*, *C02B157*, *C02B158*, *C02B159*, *C02B160*, *C02B161*, *C02B162*, *C02B163*, *C02B164*, *C02B165*, *C02B166*, *C02B167*, *C02B168*, *C02B169*, *C02B170*, *C02B171*, *C02B172*, *C02B173*, *C02B174*, *C02B175*, *C02B176*, *C02B177*, *C02B178*, *C02B179*, *C02B180*, *C02B181*, *C02B182*, *C02B183*, *C02B184*, *C02B185*, *C02B186*, *C02B187*, *C02B188*, *C02B189*, *C02B190*, *C02B191*, *C02B192*, *C02B193*, *C02B194*, *C02B195*, *C02B196*, *C02B197*, *C02B198*, *C02B199*, *C02B200*, *C02B201*, *C02B202*, *C02B203*, *C02B204*, *C02B205*, *C02B206*, *C02B207*, *C02B208*, *C02B209*, *C02B210*, *C02B211*, *C02B212*, *C02B213*, *C02B214*, *C02B215*, *C02B216*, *C02B217*, *C02B218*, *C02B219*, *C02B220*, *C02B221*, *C02B222*, *C02B223*, *C02B224*, *C02B225*, *C02B226*, *C02B227*, *C02B228*, *C02B229*, *C02B230*, *C02B231*, *C02B232*, *C02B233*, *C02B234*, *C02B235*, *C02B236*, *C02B237*, *C02B238*, *C02B239*, *C02B240*, *C02B241*, *C02B242*, *C02B243*, *C02B244*, *C02B245*, *C02B246*, *C02B247*, *C02B248*, *C02B249*, *C02B250*, *C02B251*, *C02B252*, *C02B253*, *C02B254*, *C02B255*, *C02B256*, *C02B257*, *C02B258*, *C02B259*, *C02B260*, *C02B261*, *C02B262*, *C02B263*, *C02B264*, *C02B265*, *C02B266*, *C02B267*, *C02B268*, *C02B269*, *C02B270*, *C02B271*, *C02B272*, *C02B273*, *C02B274*, *C02B275*, *C02B276*, *C02B277*, *C02B278*, *C02B279*, *C02B280*, *C02B281*, *C02B282*, *C02B283*, *C02B284*, *C02B285*, *C02B286*, *C02B287*, *C02B288*, *C02B289*, *C02B290*, *C02B291*, *C02B292*, *C02B293*, *C02B294*, *C02B295*, *C02B296*, *C02B297*, *C02B298*, *C02B299*, *C02B300*, *C02B301*, *C02B302*, *C02B303*, *C02B304*, *C02B305*, *C02B306*, *C02B307*, *C02B308*, *C02B309*, *C02B310*, *C02B311*, *C02B312*, *C02B313*, *C02B314*, *C02B315*, *C02B316*, *C02B317*, *C02B318*, *C02B319*, *C02B320*, *C02B321*, *C02B322*, *C02B323*, *C02B324*, *C02B325*, *C02B326*, *C02B327*, *C02B328*, *C02B329*, *C02B330*, *C02B331*, *C02B332*, *C02B333*, *C02B334*, *C02B335*, *C02B336*, *C02B337*, *C02B338*, *C02B339*, *C02B340*, *C02B341*, *C02B342*, *C02B343*, *C02B344*, *C02B345*, *C*

(221)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

[00000000]

[00000000]

61. A method for delivering one or more fusion proteins for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an associated neuro-targeted bacteria comprising one or more fusion proteins, wherein said associated neuro-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative anaerobe and fusion proteins comprise a signal sequence and an effector molecule.
62. A method for delivering one or more fusion proteins for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an associated neuro-targeted bacteria comprising one or more fusion proteins encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said associated neuro-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative anaerobe and said fusion proteins comprise a fusion protein and an effector molecule.
63. The method of claim 61 or 62, wherein the fusion proteins further comprise a signal sequence.
64. The method of claim 61 or 62, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.
65. The method of claim 61 or 62, wherein the fusion protein is derived from the HIV TAT protein, the neurotrophic factor (neurotrophin), Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) latency-associated sequence (LAS), herpes simplex virus (HSV), lentivirus, baculovirus, or baculovirus.
66. The method of claim 61, 62 or 63, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.
67. The method of claim 61, 62 or 63, wherein the associated neuro-targeted bacteria further encodes one or more neuro-targeted bacteria encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.
68. A method of treating a solid tumor cancer in a subject, comprising administering one or more pharmaceutical agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an associated neuro-targeted bacteria comprising one or more neuro-targeted bacteria encoding one or more primary effector

- 114 -

SYSTEMS

78. The method of claim 77, wherein the bacteriocin family number is ColB1, ColB2, ColB3, ColB4, ColB5, ColB6, ColB7, ColB8, ColB9, ColB10, ColB11, ColB12, ColB13, ColB14, ColB15, ColB16, ColB17, ColB18, ColB19, ColB20, ColB21, ColB22, ColB23, ColB24, ColB25, ColB26, ColB27, ColB28, ColB29, ColB30, ColB31, ColB32, ColB33, ColB34, ColB35, ColB36, ColB37, ColB38, ColB39, ColB40, ColB41, ColB42, ColB43, ColB44, ColB45, ColB46, ColB47, ColB48, ColB49, ColB50, ColB51, ColB52, ColB53, ColB54, ColB55, ColB56, ColB57, ColB58, ColB59, ColB60, ColB61, ColB62, ColB63, ColB64, ColB65, ColB66, ColB67, ColB68, ColB69, ColB70, ColB71, ColB72, ColB73, ColB74, ColB75, ColB76, ColB77, ColB78, ColB79, ColB80, ColB81, ColB82, ColB83, ColB84, ColB85, ColB86, ColB87, ColB88, ColB89, ColB90, ColB91, ColB92, ColB93, ColB94, ColB95, ColB96, ColB97, ColB98, ColB99, ColB100, ColB101, ColB102, ColB103, ColB104, ColB105, ColB106, ColB107, ColB108, ColB109, ColB110, ColB111, ColB112, ColB113, ColB114, ColB115, ColB116, ColB117, ColB118, ColB119, ColB120, ColB121, ColB122, ColB123, ColB124, ColB125, ColB126, ColB127, ColB128, ColB129, ColB130, ColB131, ColB132, ColB133, ColB134, ColB135, ColB136, ColB137, ColB138, ColB139, ColB140, ColB141, ColB142, ColB143, ColB144, ColB145, ColB146, ColB147, ColB148, ColB149, ColB150, ColB151, ColB152, ColB153, ColB154, ColB155, ColB156, ColB157, ColB158, ColB159, ColB160, ColB161, ColB162, ColB163, ColB164, ColB165, ColB166, ColB167, ColB168, ColB169, ColB170, ColB171, ColB172, ColB173, ColB174, ColB175, ColB176, ColB177, ColB178, ColB179, ColB180, ColB181, ColB182, ColB183, ColB184, ColB185, ColB186, ColB187, ColB188, ColB189, ColB190, ColB191, ColB192, ColB193, ColB194, ColB195, ColB196, ColB197, ColB198, ColB199, ColB200, ColB201, ColB202, ColB203, ColB204, ColB205, ColB206, ColB207, ColB208, ColB209, ColB210, ColB211, ColB212, ColB213, ColB214, ColB215, ColB216, ColB217, ColB218, ColB219, ColB220, ColB221, ColB222, ColB223, ColB224, ColB225, ColB226, ColB227, ColB228, ColB229, ColB230, ColB231, ColB232, ColB233, ColB234, ColB235, ColB236, ColB237, ColB238, ColB239, ColB240, ColB241, ColB242, ColB243, ColB244, ColB245, ColB246, ColB247, ColB248, ColB249, ColB250, ColB251, ColB252, ColB253, ColB254, ColB255, ColB256, ColB257, ColB258, ColB259, ColB260, ColB261, ColB262, ColB263, ColB264, ColB265, ColB266, ColB267, ColB268, ColB269, ColB270, ColB271, ColB272, ColB273, ColB274, ColB275, ColB276, ColB277, ColB278, ColB279, ColB280, ColB281, ColB282, ColB283, ColB284, ColB285, ColB286, ColB287, ColB288, ColB289, ColB290, ColB291, ColB292, ColB293, ColB294, ColB295, ColB296, ColB297, ColB298, ColB299, ColB300, ColB301, ColB302, ColB303, ColB304, ColB305, ColB306, ColB307, ColB308, ColB309, ColB310, ColB311, ColB312, ColB313, ColB314, ColB315, ColB316, ColB317, ColB318, ColB319, ColB320, ColB321, ColB322, ColB323, ColB324, ColB325, ColB326, ColB327, ColB328, ColB329, ColB330, ColB331, ColB332, ColB333, ColB334, ColB335, ColB336, ColB337, ColB338, ColB339, ColB340, ColB341, ColB342, ColB343, ColB344, ColB345, ColB346, ColB347, ColB348, ColB349, ColB350, ColB351, ColB352, ColB353, ColB354, ColB355, ColB356, ColB357, ColB358, ColB359, ColB360, ColB361, ColB362, ColB363, ColB364, ColB365, ColB366, ColB367, ColB368, ColB369, ColB370, ColB371, ColB372, ColB373, ColB374, ColB375, ColB376, ColB377, ColB378, ColB379, ColB380, ColB381, ColB382, ColB383, ColB384, ColB385, ColB386, ColB387, ColB388, ColB389, ColB390, ColB391, ColB392, ColB393, ColB394, ColB395, ColB396, ColB397, ColB398, ColB399, ColB400, ColB401, ColB402, ColB403, ColB404, ColB405, ColB406, ColB407, ColB408, ColB409, ColB410, ColB411, ColB412, ColB413, ColB414, ColB415, ColB416, ColB417, ColB418, ColB419, ColB420, ColB421, ColB422, ColB423, ColB424, ColB425, ColB426, ColB427, ColB428, ColB429, ColB430, ColB431, ColB432, ColB433, ColB434, ColB435, ColB436, ColB437, ColB438, ColB439, ColB440, ColB441, ColB442, ColB443, ColB444, ColB445, ColB446, ColB447, ColB448, ColB449, ColB450, ColB451, ColB452, ColB453, ColB454, ColB455, ColB456, ColB457, ColB458, ColB459, ColB460, ColB461, ColB462, ColB463, ColB464, ColB465, ColB466, ColB467, ColB468, ColB469, ColB470, ColB471, ColB472, ColB473, ColB474, ColB475, ColB476, ColB477, ColB478, ColB479, ColB480, ColB481, ColB482, ColB483, ColB484, ColB485, ColB486, ColB487, ColB488, ColB489, ColB490, ColB491, ColB492, ColB493, ColB494, ColB495, ColB496, ColB497, ColB498, ColB499, ColB500, ColB501, ColB502, ColB503, ColB504, ColB505, ColB506, ColB507, ColB508, ColB509, ColB510, ColB511, ColB512, ColB513, ColB514, ColB515, ColB516, ColB517, ColB518, ColB519, ColB520, ColB521, ColB522, ColB523, ColB524, ColB525, ColB526, ColB527, ColB528, ColB529, ColB530, ColB531, ColB532, ColB533, ColB534, ColB535, ColB536, ColB537, ColB538, ColB539, ColB540, ColB541, ColB542, ColB543, ColB544, ColB545, ColB546, ColB547, ColB548, ColB549, ColB550, ColB551, ColB552, ColB553, ColB554, ColB555, ColB556, ColB557, ColB558, ColB559, ColB560, ColB561, ColB562, ColB563, ColB564, ColB565, ColB566, ColB567, ColB568, ColB569, ColB570, ColB571, ColB572, ColB573, ColB574, ColB575, ColB576, ColB577, ColB578, ColB579, ColB580, ColB581, ColB582, ColB583, ColB584, ColB585, ColB586, ColB587, ColB588, ColB589, ColB590, ColB591, ColB592, ColB593, ColB594, ColB595, ColB596, ColB597, ColB598, ColB599, ColB600, ColB601, ColB602, ColB603, ColB604, ColB605, ColB606, ColB607, ColB608, ColB609, ColB610, ColB611, ColB612, ColB613, ColB614, ColB615, ColB616, ColB617, ColB618, ColB619, ColB620, ColB621, ColB622, ColB623, ColB624, ColB625, ColB626, ColB627, ColB628, ColB629, ColB630, ColB631, ColB632, ColB633, ColB634, ColB635, ColB636, ColB637, ColB638, ColB639, ColB640, ColB641, ColB642, ColB643, ColB644, ColB645, ColB646, ColB647, ColB648, ColB649, ColB650, ColB651, ColB652, ColB653, ColB654, ColB655, ColB656, ColB657, ColB658, ColB659, ColB660, ColB661, ColB662, ColB663, ColB664, ColB665, ColB666, ColB667, ColB668, ColB669, ColB670, ColB671, ColB672, ColB673, ColB674, ColB675, ColB676, ColB677, ColB678, ColB679, ColB680, ColB681, ColB682, ColB683, ColB684, ColB685, ColB686, ColB687, ColB688, ColB689, ColB690, ColB691, ColB692, ColB693, ColB694, ColB695, ColB696, ColB697, Col

PC VATTEN/14561

79. The position of atom 71 or 72, whose is at least one of the primary effects in the reaction is a consequence of the following reaction.

84. The method of claim 71 or 72, wherein at least one of the primary effluents is benzene, toluene, xylene, CNE1, CNE2, or PMT.

23. The method of claim 22, wherein the secondary effector molecule is an immunoglobulin, an anti-tumor protein, an apoptosis-inducing enzyme, an anti-oxidant, a cytotoxic, or an enzyme.

85. The action of olefin 74, wherein the amine is a donor-acceptor heterocycle, gives an enhanced release system.

87. A method in treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents to the animal consistently or intermittently with an administered tumor-injected bacteria comprising one or more virulent and non-virulent bacteria, wherein the bacteria are previously specially killed to cause more penetration, wherein said tumor-injected bacteria is a therotrophic aerobic or facultative anaerobic and acid or proteolytic bacterium of a mixed occurrence and of a fibroblast origin.

• 136 •

PCT/US2004/011272

something, one or more surface solid molecules coupling one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said associated outer-sunged bacteria is a Gram-negative aerobic or facultative anaerobic and total fusion protein complexes in very small and in efficient amounts.

19. The recital of claim 18, wherein said device further comprises a
5 signal receiver.

29 The method of claim 27 or 28, wherein the signal sequence is an OmpA-like
signal.

91. The method of claims 85 or 89, wherein the fatty particles is derived from the HIV YAT protein, the active species benzodioxane (paracetamol), Kaposi fibroblast growth factor (KGF) chemokine-transferring sequence (RANTES), herpes simplex virus VP22, heparin sulfate, heparan sulfate, or heparinase.

92. The method of claim 87, 88 or 89, wherein the silicon molecule is primary or tertiary silicon molecule.

92. The method of claim 87, 88 or 89, wherein the effluent further comprises bacteria for decomposing organic waste and/or nutrients contained in the effluent and/or for producing a product.

94. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and one or more tumor-injected bacteria.

95. A fusion protein consisting of a Cys⁴-like protein and an riboflavin molecule.

96. A fusion protein comprising a signal sequence, a fatty peptide and an effector molecule

92. The figures predict of claim 96, wherein the signal represents an Omega-1Rc protein.

94. The fusion protein of clone 94, wherein the fatty peptide is deleted from the HIV TAT protein, the antitumor peptide leucodecane male (penciclovir), Kaposi fibroblast growth factor (FGF), neuraminidase-inhibiting substance (MIS), herpes simplex virus VP22,

(225)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/0801

PCV036011241

bonded to the, benzyl group, or benzyl group.

99. The fusion protein of claim 95 or 96, wherein the effector molecule is a polypeptide or non-peptide effector molecule.

5

10

15

20

25

30

35

* 112 *

(226)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W0401280

PCW080030241

1/42

ATG GTA GGT AAC TCG TCT CCG ACT CCG TCG GAT AAG CCG GTT GCT
 N V R S S G R T P S D K P F A
 CAT GTA GTT GCT AAC GCT CAG GCA GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTT
 R Y V A H P Q A E G Q L Q Y L
 AAG GGT CCG GCT AAC GGC CTG CTG GCA AAC GGC GTT GAG CTC GGT
 H R R A H A L L A H G V E L R
 GAT AAC CAG CTC GTG GTA GCT TCT GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT
 D H O L V Y P S K G L Y L I Y
 TCT CAA GTA CTG TGC AAG GGT CAG GGC TGC CCG TCG ACT CAT GGT
 S Q Y L F K G Q G C P S T H V
 CTG CTG ACT CAG GGC AAG GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT
 L L T H T I S R I A V S I Q T
 AAA GTT AAC CTG CTG AAC GGT ATC AAG TCT CCG TCG CAG GGT GAA
 K V H L L S A I K S P C Q R E
 ACT CCG GAT GCA GAA GAG AAA CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAT
 T P E G A E A K P H Y E P I Y
 CTG GGT GGC GTA YTT CAA CTG GAG AAA GGT GAT CCG CTG TCG GCA
 L G G Y F Q L E K G D R L S A
 GAA ATC AAC GGT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 E I H R P D Y L D F A E S G Q
 GTG TAC TAC GGT ATT AAG GCA CTG TGA
 G Y F G I T A L A

FIG.1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(227)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W04/02289

PCT/JP04/02289

2/42

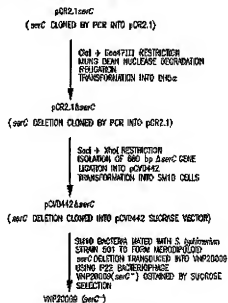
DERIVATION OF THE VNP20008(*avrC*-) STRAIN.

FIG.2

CONTINUOUS SHEET (PAGE NO)

(228)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

W01/0307

PCT/GB93/02041

5/42

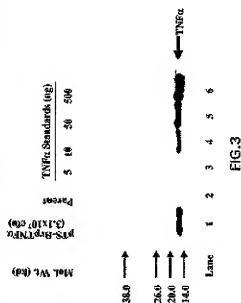
Quantitation of TNF α expression by pTS-BpTNF α Clone 2.

FIG.3

SUBSTITUTE SHEET (PAGE 26)

(229)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 15/08/0

PCT/KR2002/01291

4/42

ATG AAA AAG ACA GCT ATC GGG ATT GGA GAG GCA CTG GCT GGT TTC
 N K K T A I A I A V A L A G F
 GCT ACC GTA GGG CAG GGC GAT ATG GTA GAG AGC TCG GGT GGT ACT
 A T V A Q A H H V R S S R T
 GAG TTC GAT AAG CGT GGT GCT GAT GTA GGT GCT AAG GCT CAG GCG
 P S Q K P V A H V Y A N P Q A
 GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG AAG GGT GGC GAT AAG GGC CTG CTG
 S G Q L Q V L H R R A N A L L
 GCA AAG GGC GGT GAG CTC GGT GAT AAG CAG CTC GAG GTA GGT TTC
 A H G Y E L R D R Q L V Y P S
 GAA GGT CTG TAC CAG ATC TAT TCT CAA GTA CTG TTC AAG GGT CAG
 E G L T L I Y S Q V C F K G Q
 GGC TGC CGT TCG ACT GAT GGT CAG CTG ACT CAG ACC ATC ACC GGT
 G C P S T H V L L T H T I S R
 ATT GGT GTA TCT TAC CAG ACC AAA GGT AAG CTG CTG ACC GAT ATC
 I A V S Y Q T K Y H L L S A J
 AAG TCT CGS TGC CAG GGT GAA ACT CGC GAG GGT GCA GAA CGA AAA
 K S P C Q R E T P E G A E A K
 GCA TGG TAT GAA CGG ATC TAC CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG
 P W Y E P I Y L G G V F Q L E
 AAA GGT GAG GGT CTG TGC GGA GAA ATC AAG GGT GAT GAT TAT CTA
 K Q D R L S A E I H R P O I L
 GAT TTC GAT GAA TCT GGC CAG CTG TAC TTC GGT AAT ATC GCA CTG
 D F A E S G Q T Y F G I I A L

TAA
#

FIG.4

SUBSEQUENT SEQUENCE (PAGE 2)

(230)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 03/0287

PC2003010204

Expression and processing of a *trc* promoter-driven *ompA*-TRAIL fusion gene product in JM109 bacteria.

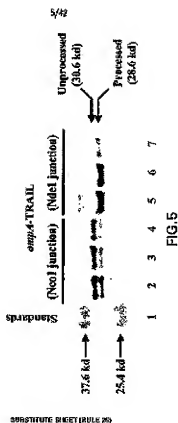


FIG.5

(231)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD NUMBER

PCV0000000000

6/12

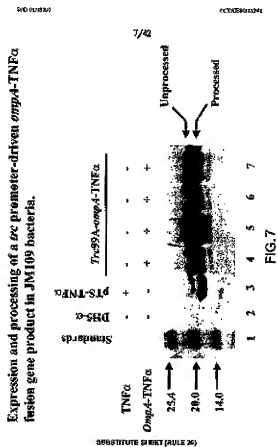
ATG AAA AAG ACA GCT ATC GGG AAT GGA GTG GCA CAG GCT GGT TTC
 G K K P A I A I A Y A L A G F
 GCT ACC CTA GGG GAG AGC GAT AGT GGT AAG GAG CTG AAG GAG ATG
 A T V K G A H N G H E L R G N
 CAG GAG AAG TAC TTC AAA AGT GAG AGT GCT TGT TTC TTA AAA GAG
 Q D N Y S K S G I A C F L K E
 GGT GAG AGT TAT TGG GAG GCG AAG GAG GAG AAG AAT ATE AAG AAG
 D D S Y W D P D D E E S H H S
 CTC TAC TGG GAG GAG AAG TGG GAG CTC GGT CAG CTC GTT AAG AAG
 P C M Q Y K W Q L R Q L F G R
 ATG ATT TTG AAG ACC TCT GAG GAG ACC ATT TCT ACA GTT GAG AAG
 H I L R T S E E T I S Y F Q E
 AAG GAG GAG AAT AAT TCT GCT CTA GTG AAG GAG AAG GGT GCT CAG
 K Q Q H I S P L P R E K Q P Q
 AAG GAG AAG GCT CAG AAT GGT GAG ACC GAG GAG AAG AAG AAG AAG AAG
 R Y A A H I I G T R G R S E T
 TTG GCT TCT CAG AAG TCC AAG AAT GAG AAG GCT CTG AAG GAG AAG
 L S S P N S K H E K A L G R R
 ATA AAG TCC TGG GAG TCA TCA AAG AAG GAG GAT TCA TTC CTG AAG
 I H S P E S S R S G H S T C S
 AAG TGG GAG TGG AAG AAG GGT GAG GAG GCT ATC GAT GAG AAG AAG
 H L H L R B G E L V I H E K G
 TTT TAC TAC ATC TAT TCC GAG AAG TAC TTT GAG TTT GAG GAG GAG
 F Y Y I Y S Q T Y F R P Q E C
 ATA AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
 I K E G T E H D E Q H Y D Y I
 TAC AAG TAC AAG AAT TAT GCT GCT GCT ATA TTT TTT GAG AAG AAT
 V K Y Y S Y P D P I L L H K S
 GCT AAG AAT AAT TAT TAT TAT AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
 A R N S C H S A D A E Y G L Y
 TCC ATC TAT CAG GAG GAG AAG TTT GAG GGT AAG AAG AAT AAG AAG AAG
 S I Y G G G I F E L K E H D A
 AAT TTT GGT TCT GTA AAG AAG GAG GAG TTT ATA GAG AAG GAG GAT
 I F V S V T B E H L E D H U H
 GAG GAG AAT TTT TTT GAG GAG TTT TTT GAT GAT TAA
 E A S F F G A I L Y H *

FIG.6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(232)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



(233)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W000000

PCU000000000

8/42

ATE AFA ARE AGE AET CTE GEB CFT CTB CTC TTS TTA TTE CTE
 H K K F A L A L L L L L L A L
 ACT AGE ATA AEG CAG GCG GGT OCT ACT AGC TGG AGC ACT ANG AAA
 T S V A Q A A P T S S S T K K
 ACT CAA CTA TTB GAB GAT CTE CTB CAT CTG CAG ATG ATT
 T Q L O L E H L L L D L Q H I
 CTE ATE GSC ATC NAT ANG TAC AAG AAC OCT ANG CTE ACT GCG AEG
 L H G I H N Y K A P K L T R H
 CTE ACT TTC AAA TTC TAC ATB CEB AFA ANG GCT AGC GAG CTC AAA
 L F F K F Y H P K K A T E L K
 CAT CTC CAG TGC CTA GAG GAG GAG CTA AGC GCG CTA GAG ATA
 H L Q C L E E E L K P L H E Y
 CTT ANG CTE GCA GAB TCT ANG AAT TTC CAC CTA GCG GAT GAC
 L H L A Q S K N F H L R P B D
 CTA ATE TGC AAG AET ATE ATA ATE GAT CTT GAG CTA AAG GGA TCC
 L I S H I H V I Y L E L K G S
 GAA AGC AGC TTC AEG TCG GAA TAC GAT GAG GAA AGC GCG AGC ATT
 E T T F H C E Y A B E T A T I
 GTC GAG TTC CTC AAG GAT TGG ATC AGC TTT GCG GAA TGG ATG ATY
 P E F L H R W I T F A Q S I I
 AEC AGC TTA ACT TAA
 S T L T *

FIG.8

SUPERFUTURE SHORTY (RULE 26)

(234)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

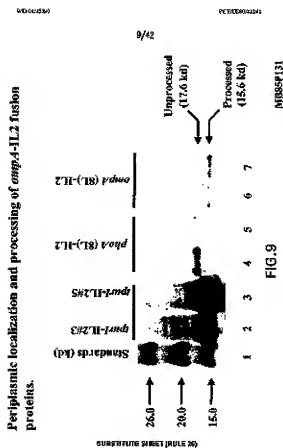


FIG. 9

(235)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WG 03/20/00

PCT/JP00/02242

10/42

ATG AAA GAG TGG ACT CTG GGG GTT CTG CTC TTA GGG CTA
 H K Q S T L A L L L L L L A L
 ACT AGT GTT GCG AAA GCG GCT CCT ACT AGC TGG AGC ACT AAG AAA
 T S V A K A A A T S S S T K K
 ACT CAA CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
 T Q L Q L E E L L L L D L Q N I
 CTG AAT GAC ATC AAT AAG TGG AAG AAG CCT AAG CTG ACT GGC ATG
 L H G I N Y Y K M P K L T R H
 CTG ACT TTG AAA TTC TAC ATG GCG AAG AAG GCT ACC GAG CTC AAA
 L Y F F F Y H P K K A T G L K
 CAT CTC CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG GCG CTG GAG GAA GTA
 H L O C L E E E L K P L G E V
 CTT AAG CTG GCA GAG TGT AAG AAG TTC CAC CTG GGT GCG GAC
 L H L A Q S K H F H L R P R D
 GAG AAG TGG AAG ATC AAT GGA AAG GTT CTG GAG CTG AAG GGA TGC
 L I S H I X Y I Y L E L N B S
 GAA AAG AGC TTC ATG TGC GGA TAC GGT GAG GAA AAG GGC AAG ATT
 E T T F H C E Y G D E T A T T
 GAG GAG TTC CTG AAG GAT TGG AAG ACC TTT GCG CAA TGG ATC ATT
 V E F L H R M I Y F A Q S I I
 AAG AGS TTA ACT TAA
 S F L T *

FIG.10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(236)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W0107000

PCV0000000000

11/42

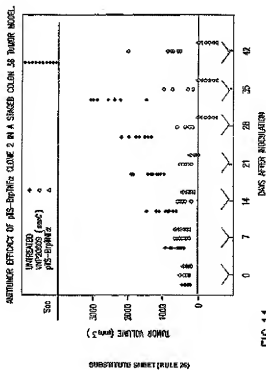


FIG. 11

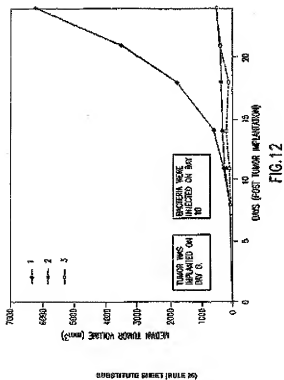
(237)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

50147500

PCT/JP03/02241

12/42



(238)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

NO. 10/12/07

PCVAD00002201

13/42

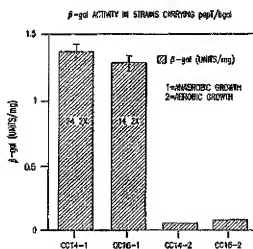


FIG.13A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(239)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

WO/2004/012241

CYTOSOLIC

14/42

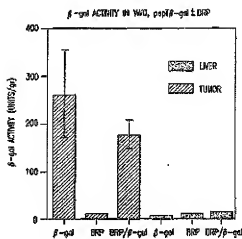


FIG.13B

COMPUTER DIBNET (RULE 26)

(240)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W04000000

PCV4386/12742

15/42

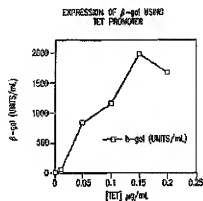


FIG.14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(241)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

WO/01/0287

PCT/JP00/03204

16/62

~25 kD →
HexaHIS-αdestabilin

+ - + - + -

FIG. 15A

~25 kD →
HexaHIS-αdestabilin

+ + + + + - + -

FIG. 15B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(242)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

00000000

PC100800000

17/42

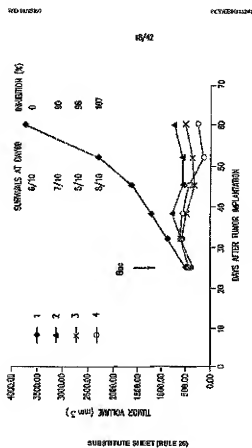
~25kB →
MicroWIS-embedded

FIG.16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

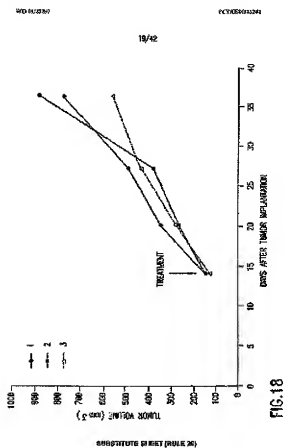
(243)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



(244)

JP 2004-509042 A 2004.1.8



(245)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O (1/27/0)

VCH25801227

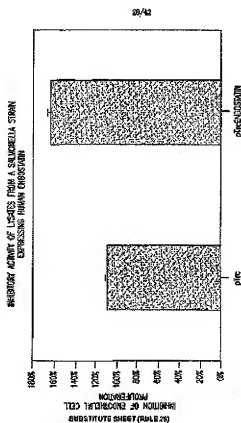


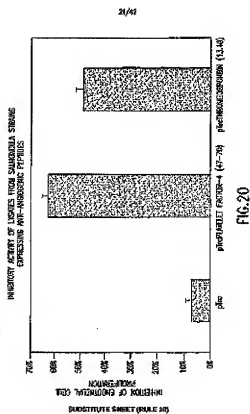
FIG.19

(246)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

W0102007

PCV030012042



(247)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W01000001

PC0000000001

22/42

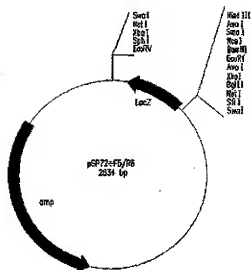


FIG.21

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(251)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

WO Number

PCT/JP04/12212

26/42

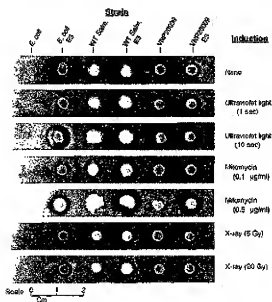


FIG.25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

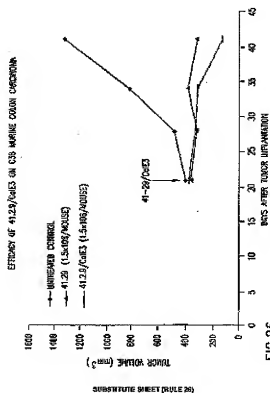
(252)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

2010-2011

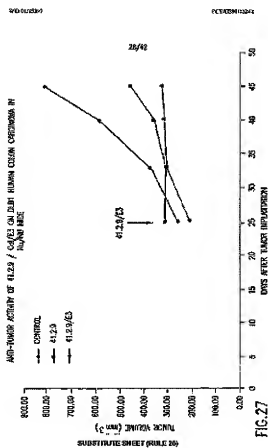
PCY/ISSM 22742

27/42



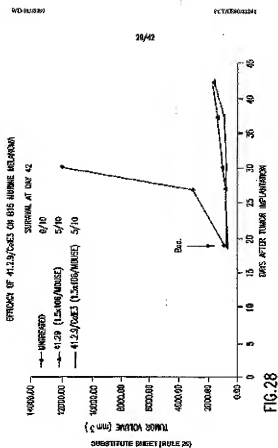
(253)

JP 2004-500642 A 2004.1.8



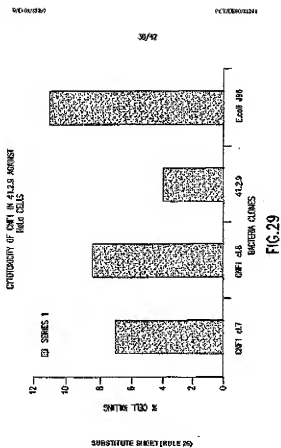
(254)

JP 2004-500642 A 2004.1.8



(255)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



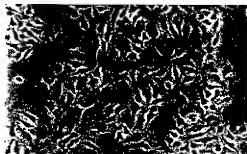
(256)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

WDHJ281

PCT/JP00/0281

31/42



HDLA untreated (20x Obj.)

FIG. 30A



HDLA CMF1 in C115 cl.15 (20x Obj.)

FIG. 30B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 29)

for YAMBA01a and b

32/42

[illegible]

FIG. 31

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(258)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/01267

PCT/JP99/02244

33/42

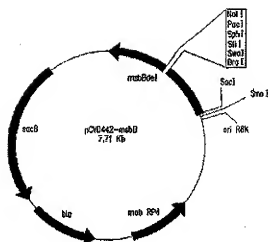


FIG.32

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

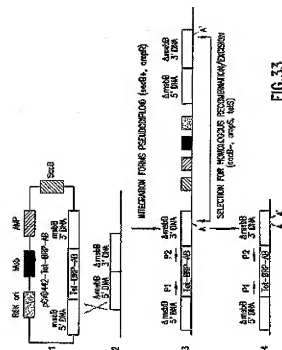
(259)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O 61/78767

PCT/KR99/01241

34/42



SUBSTITUTE SHEET (TABLE 20)

FIG. 33

(260)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W01512897

PCT/JP2003/012897

35/42

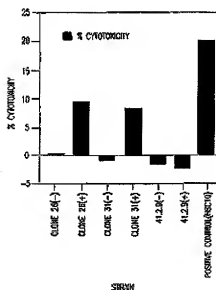


FIG.34

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(261)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

504534

PCTAC00001248

36/42



FIG.35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(262)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/DAL/2007

PCEASR/01204

37/42

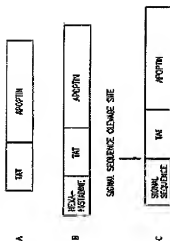


FIG. 36

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(263)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W01A1/0001

PCT/JP00/000001

39/42

Protein Sequence of 955-4 F

Length of 955-4 F: 555 (aa) aligned from 1 to: 551

Translated from: F (aa) (Exon regions)

Genetic Code used: (Nucleic acid), Mod. Aug 86, 2000 1:08 PM

```

Frame 1      N A Y G E K E K R R Q R R R N H
             NAG ACC ATG GCT TAT GGC AGA AAA AAA AGA AGA GAG AGA AGA ATC AAC
             9      15      27      36      45

A L Q E D T P P C F S T V D R P P T S
GGG CTG GAG AAA GAT ACC CCG GCG GCG AGC AGC CCG TTT GTC CCG CCG AGC TCC
69      90      78      87      96

S H P L E T P H C R E I R I G I R A I
TCC CAG CCG CTG GAG ACC CCG GAT TCC CCG GAA ATC CAG ATC AGC ATC GAG GAG GAG GAG
117     126     120     144     153     162

T I I I S L C G C A H A R A P Y L R S
AGC ATC ACC CCG CTG TTC CTC TCC TCC GCG AAA GCG CAG CAG CCG AGC CCG CCG TCC
126     188     195     201     220     219

A T A D H S E N T G F K N Y P D L R P
GGG ACC GCG GAG AAC TCC GAA AAC AGC GGC TTT GAA AGC GTC CCG GAT CTG CCG AGC
231     240     249     258     257     276

D Q P K P P S K E H S E D P S T F R V
HAG GAG CCG GAG CCG CCG TCC AAA AAA GAG TCC GAT TCC TCC GAA TTT CAG GAT
288     297     306     315     324     333

S S L K E S L E I T T P S R P R F A R
TCC GAG CTG AAA GAA TCC GAT ATC ACC AGC GCG TCC GAG CCG CCG AGC GTC CCG
345     354     363     372     381     399

R C I R L
GAC TAC ATC CCG CTC TGA AGG CTT GGC TGT TTT GCG GAA TGA GAG AGG ATG TTC AGC
402     411     420     429     437

GTS ATA CCG ATT AAA TTA GAA CCG AGG AGC GGG CTG AAA AAA CAG AAT TTG GAT GAT
469     478     487     496     505     514

GAC AAT ACC GCG GTC GTC CCA GGT GAC CCG ATG CCG AGC TCA GA
515     524     533     542

```

FIG.37

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(264)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W01010209

PCT020000204

39/42

Protein Sequence of 34936 aa

Length of T00018 (aa): 753 bp; Linear Score: 9 km 445;

Translated from: 750: 427 (Entire region);

Genetic Code used: Universal; Nov, Aug 14, 2000 9:19 PM

Protein 1 H A M M H H H H Y G R I K R L
 N88 ACC AGS GCT CAT CAC CAT CAC CAC CAT TAT GGC GGC AAA AAA GGC GGT
 9 18 27 36 45
 C Q R R R H N A L Q S D T P P G P S Y V
 CAG CAC CCG GGC ATG AAC CGG CTG CAG GAA GAT ACC GAG CCG GGC CCG TCC ACC GTC
 55 64 73 82 91 100 109 118 127 136
 F R P P T S S R F L E T P R C S E L R
 TTT CCG CGG CGG ACC TCC TCC CCG CCG GAA ACC CCG GAT TCC CCG GAA ATC CCG
 145 154 163 172 181 190 200 209 218 227
 I G I L H A T I T L S L C O C A N A R
 ATC CCG ATC GCG GGC ATC ACC ATC CCG TCC CTG GGC TCC GCG AAC GCG CCG
 235 244 253 262 271 280 289 298 307 316
 A P T L R S A T A D W S E N I G F K W
 GAG CCG ACC CTG CTG TCC GCG ATC GCG GAT AAC TCG GAG AAC ACC GGC TTT GAG AAC
 325 334 343 352 361 370 379 388 397 406
 V P D L R T D D F K P P S K K R S C D
 GTC CCG GAT CCG CCG ACC GAT GAT GAT GAT AAA CCG CCG TCC AAA AAC CCG TCC TCC GAT
 415 424 433 442 451 460 469 478 487 496
 P S E Y R V S E L K E S L I Y T P S
 CCG TCC GAA TTT CCG GGC GCG GCG CCG GAG CCG TCC CCG ATC ACC ACC ACC CCG TCC
 505 514 523 532 541 550 559 568 577 586
 R P S T A R R C I N L A
 CCG CCG CCG ACC CCG CCG CCG TCC ATC CCG CCG TCC AAA CTT GCG TTT TTT
 595 604 613 622 631 640 649 658 667 676

FIG.38

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

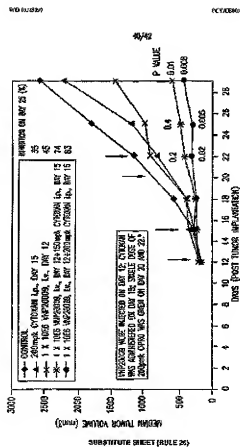


FIG. 39

(256)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

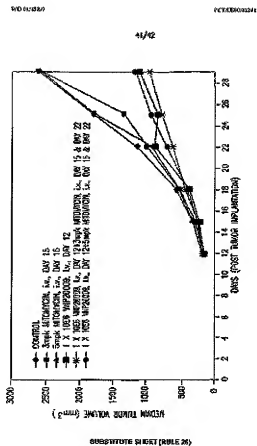
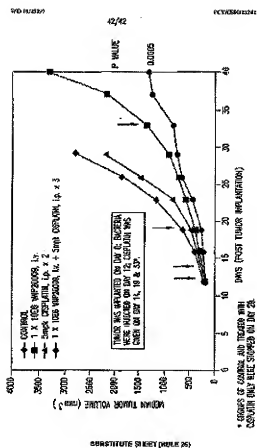


FIG. 40

(267)

JP 2004-500042 A 2004.1.8




```

      4400: 5
      arg gld cgs sgs bcc tot epc wex pcc tcc snc zng oos dlt osc cat
      lat Val Rdy Ser Str Ser Arg Tbx Fee Sec Ang Ayo Zoo Vol Ali Jls
      1          6          10         14

```

[illegible]

[illegible]

<270> 0
 <280> 140
 <290> 107
 <320> Antidivisional Regency

[illegible]

PCV955 INDOUR

3.

PCYB18-1000

4

[illegible]

06/07/2015 09:02:32

432

462

44

PROCESS ANALYSIS

9

(277)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WDR0001?	ECT01000202
79c hla dls dcr kls zla dcr vkr uwr zkr	
145	
<280> 15 <281> 24 <210> 200 <220> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<100> 15 agcagcagca accaggggaa gaaagg	25
<210> 24 <211> 25 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Reverse primer	
<400> 20 agcagcagc agcagcagc agcagc	35
<210> 25 <211> 26 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<400> 27 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	45
<210> 26 <211> 27 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Reverse primer	
<400> 28 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	55
<210> 27 <211> 28 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<400> 30 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	65
<210> 28 <211> 29 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<400> 32 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	75
<210> 29 <211> 30 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<400> 34 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	85
<210> 30 <211> 31 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<400> 36 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	95
<210> 31 <211> 32 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<400> 38 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	105
<210> 32 <211> 33 <212> 200 <213> Artificial Sequence <330> <321> Forward primer	
<400> 40 agcagcagc agcagcagc agcagcagc	115

[illegible]

12

13

© 2003 Blackwell Publishing Ltd

37

Aggregations lacking spherical symmetry

<231> 12

५५५५५ ३-

+406- 74

[illegible]

15

16

17

WU F01387	PCV1013872
ctgagagaa c	71
<210> 44	
<210> 45	
<211> DNA	
<212> Artificial Sequence	
<213>	
<214> Forward primer	
<215> 44	
gctctctgga gacacatc aggcctctc agctgac	11
<211> 45	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<214>	
<215> Reverse primer	
<216> 44	
ttttttctt tttttttctt tttttttctt tttttttctt tttttttctt	21
<210> 45	
<210> 46	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<214>	
<215> Reverse primer	
<216> 44	
ttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	31
<210> 47	
gctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc	41
<211> 48	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<214>	
<215> Forward primer	
<216> 47	
gctctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc	51
<210> 48	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<214>	
<215> Reverse primer	
<216> 48	
gctctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc	61
<210> 49	
<210> 50	
gctctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc tctcctctc	71
<210> 51	
<210> 52	

19

22

和

JP 2004-500042 A 2004.1.8

[illegible]

[illegible]

(291)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

【国際公開パンフレット (コレクトバージョン)】

(50) REFERENCE TO THE PUBLICATION OF THE INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCIT)

(15) World Intellectual Property Organization
International Bureau(17) International Publication Date
12 April 2004 (21.04.2004)

PCY

(18) International Publication Number
WO 01/25397 A3(19) Inventor(s)/Applicant(s)
Name(s)NAME(S)
PCY00000000(20) Invention(s) Title(s)
Name(s)

PCY00000000

(21) Filing Date(s)
Date(s)

PCY00000000

(22) Publication Date(s)
Date(s)

PCY00000000

(23) Priority Date(s)
Date(s)

PCY00000000

(24) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(25) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(26) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(27) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(28) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(29) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(30) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(31) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(32) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(33) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(34) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(35) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(36) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(37) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(38) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(39) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(40) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(41) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(42) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(43) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(44) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(45) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(46) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(47) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(48) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(49) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(50) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(51) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(52) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(53) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(54) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(55) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(56) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(57) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(58) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(59) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(60) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(61) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(62) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(63) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(64) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

(65) Priority Name(s)
Name(s)

PCY00000000

(66) Priority Number(s)
Number(s)

PCY00000000

【國際調查報告】

[illegible]

(294)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Current applicant's file PC/AL/INT/INT/INT
<p>Item 1: Description of the invention (the invention must be described in the language of the International Search Report)</p> <p>The International Search Report must contain a description of the invention in the language of the International Search Report.</p>		
1	<input type="checkbox"/> Check Box: Does the invention relate to a new product or process?	
2	<input type="checkbox"/> Check Box: Does the invention relate to a new product or process?	
3	<input type="checkbox"/> Check Box: Does the invention relate to a new product or process?	
<p>Item 2: Description of the invention (the invention must be described in the language of the International Search Report)</p> <p>The International Search Report must contain a description of the invention in the language of the International Search Report.</p>		
1	<input type="checkbox"/> Check Box: Does the invention relate to a new product or process?	
2	<input type="checkbox"/> Check Box: Does the invention relate to a new product or process?	
3	<input checked="" type="checkbox"/> Check Box: Does the invention relate to a new product or process?	
4	<input type="checkbox"/> Check Box: Does the invention relate to a new product or process?	
<p>Remarks on the report: <input type="checkbox"/> The applicant's report is not in compliance with the requirements of the International Search Report.</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2012年12月31日 星期五

This information does not constitute an offer of insurance coverage to the individual. Application is subject to the underwriting review by the designated insurance company.

The information contains the following disclaimer: you are not insured and there is no single person responsible for your safety. It is not to be used for any other purpose, and the information is not to be used for any other purpose.

Group 1: Groups 1, 2, 4, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846,

[illegible]

Group 1, released 5-6-72, 14, 23, 29, 30, 31, 4-4-74 to 14. All records were destroyed by the FBI on 5-6-74. The FBI is not sure of the primary source of the information. The FBI is not sure of the primary source of the information. The FBI is not sure of the primary source of the information.

[illegible]

Donnerstag, 5. August 2010 17:46:33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861,

Copyright © 2000 by The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved. Printed in the United States of America. This publication is protected by copyright. Any unauthorized distribution or reproduction of this work is prohibited. This publication may be reproduced in whole or in part for personal or internal reference use only. For all other uses, permission should be obtained from The McGraw-Hill Companies, Inc. This publication is intended to provide accurate and authoritative information in regard to the subject matter covered. It is sold with the understanding that the publisher is not engaged in rendering professional service. If professional advice or other expert assistance is required, the services of a competent professional person should be sought.

GROUP 1, which is 1.0-1.27, 1.28, 1.29, 1.30, 1.31, 1.32, 1.33, 1.34, 1.35, 1.36, 1.37, 1.38, 1.39, 1.40, 1.41, 1.42, 1.43, 1.44, 1.45, 1.46, 1.47, 1.48, 1.49, 1.50, 1.51, 1.52, 1.53, 1.54, 1.55, 1.56, 1.57, 1.58, 1.59, 1.60, 1.61, 1.62, 1.63, 1.64, 1.65, 1.66, 1.67, 1.68, 1.69, 1.70, 1.71, 1.72, 1.73, 1.74, 1.75, 1.76, 1.77, 1.78, 1.79, 1.80, 1.81, 1.82, 1.83, 1.84, 1.85, 1.86, 1.87, 1.88, 1.89, 1.90, 1.91, 1.92, 1.93, 1.94, 1.95, 1.96, 1.97, 1.98, 1.99, 2.00, 2.01, 2.02, 2.03, 2.04, 2.05, 2.06, 2.07, 2.08, 2.09, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15, 2.16, 2.17, 2.18, 2.19, 2.20, 2.21, 2.22, 2.23, 2.24, 2.25, 2.26, 2.27, 2.28, 2.29, 2.30, 2.31, 2.32, 2.33, 2.34, 2.35, 2.36, 2.37, 2.38, 2.39, 2.40, 2.41, 2.42, 2.43, 2.44, 2.45, 2.46, 2.47, 2.48, 2.49, 2.50, 2.51, 2.52, 2.53, 2.54, 2.55, 2.56, 2.57, 2.58, 2.59, 2.60, 2.61, 2.62, 2.63, 2.64, 2.65, 2.66, 2.67, 2.68, 2.69, 2.70, 2.71, 2.72, 2.73, 2.74, 2.75, 2.76, 2.77, 2.78, 2.79, 2.80, 2.81, 2.82, 2.83, 2.84, 2.85, 2.86, 2.87, 2.88, 2.89, 2.90, 2.91, 2.92, 2.93, 2.94, 2.95, 2.96, 2.97, 2.98, 2.99, 3.00, 3.01, 3.02, 3.03, 3.04, 3.05, 3.06, 3.07, 3.08, 3.09, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.30, 3.31, 3.32, 3.33, 3.34, 3.35, 3.36, 3.37, 3.38, 3.39, 3.40, 3.41, 3.42, 3.43, 3.44, 3.45, 3.46, 3.47, 3.48, 3.49, 3.50, 3.51, 3.52, 3.53, 3.54, 3.55, 3.56, 3.57, 3.58, 3.59, 3.60, 3.61, 3.62, 3.63, 3.64, 3.65, 3.66, 3.67, 3.68, 3.69, 3.70, 3.71, 3.72, 3.73, 3.74, 3.75, 3.76, 3.77, 3.78, 3.79, 3.80, 3.81, 3.82, 3.83, 3.84, 3.85, 3.86, 3.87, 3.88, 3.89, 3.90, 3.91, 3.92, 3.93, 3.94, 3.95, 3.96, 3.97, 3.98, 3.99, 4.00, 4.01, 4.02, 4.03, 4.04, 4.05, 4.06, 4.07, 4.08, 4.09, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42, 4.43, 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49, 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55, 4.56, 4.57, 4.58, 4.59, 4.60, 4.61, 4.62, 4.63, 4.64, 4.65, 4.66, 4.67, 4.68, 4.69, 4.70, 4.71, 4.72, 4.73, 4.74, 4.75, 4.76, 4.77, 4.78, 4.79, 4.80, 4.81, 4.82, 4.83, 4.84, 4.85, 4.86, 4.87, 4.88, 4.89, 4.90, 4.91, 4.92, 4.93, 4.94, 4.95, 4.96, 4.97, 4.98, 4.99, 5.00, 5.01, 5.02, 5.03, 5.04, 5.05, 5.06, 5.07, 5.08, 5.09, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, 5.14, 5.15, 5.16, 5.17, 5.18, 5.19, 5.20, 5.21, 5.22, 5.23, 5.24, 5.25, 5.26, 5.27, 5.28, 5.29, 5.30, 5.31, 5.32, 5.33, 5.34, 5.35, 5.36, 5.37, 5.38, 5.39, 5.40, 5.41, 5.42, 5.43, 5.44, 5.45, 5.46, 5.47, 5.48, 5.49, 5.50, 5.51, 5.52, 5.53, 5.54, 5.55, 5.56, 5.57, 5.58, 5.59, 5.60, 5.61, 5.62, 5.63, 5.64, 5.65, 5.66, 5.67, 5.68, 5.69, 5.70, 5.71, 5.72, 5.73, 5.74, 5.75, 5.76, 5.77, 5.78, 5.79, 5.80, 5.81, 5.82, 5.83, 5.84, 5.85, 5.86, 5.87, 5.88, 5.89, 5.90, 5.91, 5.92, 5.93, 5.94, 5.95, 5.96, 5.97, 5.98, 5.99, 6.00, 6.01, 6.02, 6.03, 6.04, 6.05, 6.06, 6.07, 6.08, 6.09, 6.10, 6.11, 6.12, 6.13, 6.14, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18, 6.19, 6.20, 6.21, 6.22, 6.23, 6.24, 6.25, 6.26, 6.27, 6.28, 6.29, 6.30, 6.31, 6.32, 6.33, 6.34, 6.35, 6.36, 6.37, 6.38, 6.39, 6.40, 6.41, 6.42, 6.43, 6.44, 6.45, 6.46, 6.47, 6.48, 6.49, 6.50, 6.51, 6.52, 6.53, 6.54, 6.55, 6.56, 6.57, 6.58, 6.59, 6.60, 6.61, 6.62, 6.63, 6.64, 6.65, 6.66, 6.67, 6.68, 6.69, 6.70, 6.71, 6.72, 6.73, 6.74, 6.75, 6.76, 6.77, 6.78, 6.79, 6.80, 6.81, 6.82, 6.83, 6.84, 6.85, 6.86, 6.87, 6.88, 6.89, 6.90, 6.91, 6.92, 6.93, 6.94, 6.95, 6.96, 6.97, 6.98, 6.99, 7.00, 7.01, 7.02, 7.03, 7.04, 7.05, 7.06, 7.07, 7.08, 7.09, 7.10, 7.11, 7.12, 7.13, 7.14, 7.15, 7.16, 7.17, 7.18, 7.19, 7.20, 7.21, 7.22, 7.23, 7.24, 7.25, 7.26, 7.27, 7.28, 7.29, 7.30, 7.31, 7.32, 7.33, 7.34, 7.35, 7.36, 7.37, 7.38, 7.39, 7.40, 7.41, 7.42, 7.43, 7.44, 7.45, 7.46, 7.47, 7.48, 7.49, 7.50, 7.51, 7.52, 7.53, 7.54, 7.55, 7.56, 7.57, 7.58, 7.59, 7.60, 7.61, 7.62, 7.63, 7.64, 7.65, 7.66, 7.67, 7.68, 7.69, 7.70, 7.71, 7.72, 7.73, 7.74, 7.75, 7.76, 7.77, 7.78, 7.79, 7.80, 7.81, 7.82, 7.83, 7.84, 7.85, 7.86, 7.87, 7.88, 7.89, 7.90, 7.91, 7.92, 7.93, 7.94, 7.95, 7.96, 7.97, 7.98, 7.99, 8.00, 8.01, 8.02, 8.03, 8.04, 8.05, 8.06, 8.0

Group 2, samples 2, 6, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846,

[illegible]

ONCE IN, OUTSIDE 2, 11, 12, 14, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, 1000, 1005, 1010, 1015, 1020, 1025, 1030, 1035, 1040, 1045, 1050, 1055, 1060, 1065, 1070, 1075, 1080, 1085, 1090, 1095, 1100, 1105, 1110, 1115, 1120, 1125, 1130, 1135, 1140, 1145, 1150, 1155, 1160, 1165, 1170, 1175, 1180, 1185, 1190, 1195, 1200, 1205, 1210, 1215, 1220, 1225, 1230, 1235, 1240, 1245, 1250, 1255, 1260, 1265, 1270, 1275, 1280, 1285, 1290, 1295, 1300, 1305, 1310, 1315, 1320, 1325, 1330, 1335, 1340, 1345, 1350, 1355, 1360, 1365, 1370, 1375, 1380, 1385, 1390, 1395, 1400, 1405, 1410, 1415, 1420, 1425, 1430, 1435, 1440, 1445, 1450, 1455, 1460, 1465, 1470, 1475, 1480, 1485, 1490, 1495, 1500, 1505, 1510, 1515, 1520, 1525, 1530, 1535, 1540, 1545, 1550, 1555, 1560, 1565, 1570, 1575, 1580, 1585, 1590, 1595, 1600, 1605, 1610, 1615, 1620, 1625, 1630, 1635, 1640, 1645, 1650, 1655, 1660, 1665, 1670, 1675, 1680, 1685, 1690, 1695, 1700, 1705, 1710, 1715, 1720, 1725, 1730, 1735, 1740, 1745, 1750, 1755, 1760, 1765, 1770, 1775, 1780, 1785, 1790, 1795, 1800, 1805, 1810, 1815, 1820, 1825, 1830, 1835, 1840, 1845, 1850, 1855, 1860, 1865, 1870, 1875, 1880, 1885, 1890, 1895, 1900, 1905, 1910, 1915, 1920, 1925, 1930, 1935, 1940, 1945, 1950, 1955, 1960, 1965, 1970, 1975, 1980, 1985, 1990, 1995, 2000, 2005, 2010, 2015, 2020, 2025, 2030, 2035, 2040, 2045, 2050, 2055, 2060, 2065, 2070, 2075, 2080, 2085, 2090, 2095, 2100, 2105, 2110, 2115, 2120, 2125, 2130, 2135, 2140, 2145, 2150, 2155, 2160, 2165, 2170, 2175, 2180, 2185, 2190, 2195, 2200, 2205, 2210, 2215, 2220, 2225, 2230, 2235, 2240, 2245, 2250, 2255, 2260, 2265, 2270, 2275, 2280, 2285, 2290, 2295, 2300, 2305, 2310, 2315, 2320, 2325, 2330, 2335, 2340, 2345, 2350, 2355, 2360, 2365, 2370, 2375, 2380, 2385, 2390, 2395, 2400, 2405, 2410, 2415, 2420, 2425, 2430, 2435, 2440, 2445, 2450, 2455, 2460, 2465, 2470, 2475, 2480, 2485, 2490, 2495, 2500, 2505, 2510, 2515, 2520, 2525, 2530, 2535, 2540, 2545, 2550, 2555, 2560, 2565, 2570, 2575, 2580, 2585, 2590, 2595, 2600, 2605, 2610, 2615, 2620, 2625, 2630, 2635, 2640, 2645, 2650, 2655, 2660, 2665, 2670, 2675, 2680, 2685, 2690, 2695, 2700, 2705, 2710, 2715, 2720, 2725, 2730, 2735, 2740, 2745, 2750, 2755, 2760, 2765, 2770, 2775, 2780, 2785, 2790, 2795, 2800, 2805, 2810, 2815, 2820, 2825, 2830, 2835, 2840, 2845, 2850, 2855, 2860, 2865, 2870, 2875, 2880, 2885, 2890, 2895, 2900, 2905, 2910, 2915, 2920, 2925, 2930, 2935, 2940, 2945, 2950, 2955, 2960, 2965, 2970, 2975, 2980, 2985, 2990, 2995, 3000, 3005, 3010, 3015, 3020, 3025, 3030, 3035, 3040, 3045, 3050, 3055, 3060, 3065, 3070, 3075, 3080, 3085, 3090, 3095, 3100, 3105, 3110, 3115, 3120, 3125, 3130, 3135, 3140, 3145, 3150, 3155, 3160, 3165, 3170, 3175, 3180, 3185, 3190, 3195, 3200, 3205, 3210, 3215, 3220, 3225, 3230, 3235, 3240, 3245, 3250, 3255, 3260, 3265, 3270, 3275, 3280, 3285, 3290, 3295, 3300, 3305, 3310, 3315, 3320, 3325, 3330, 3335, 3340, 3345, 3350, 3355, 3360, 3365, 3370, 3375, 3380, 3385, 3390, 3395, 3400, 3405, 3410, 3415, 3420, 3425, 3430, 3435, 3440, 3445, 3450, 3455, 3460, 3465, 3470, 3475, 3480, 3485, 3490, 3495, 3500, 3505, 3510, 3515, 3520, 3525, 3530, 3535, 3540, 3545, 3550, 3555, 3560, 3565, 3570, 3575, 3580, 35

Entity 1A, created in 1974, was a subsidiary of the parent company, which was a private company. The subsidiary was created to manage the parent's operations in the United States. The subsidiary was a wholly owned subsidiary of the parent company. The subsidiary was created to manage the parent's operations in the United States. The subsidiary was a wholly owned subsidiary of the parent company.

Other U.S. companies (i.e., IBM, HP, etc.) have also been successful in developing business-to-business systems, especially in the financial services industry. However, the success of these companies is largely due to their focus on the financial services industry, which is a highly regulated and complex environment. This focus has allowed them to develop deep expertise in the industry and to build strong relationships with their clients. In contrast, the success of the companies mentioned above is largely due to their focus on the consumer market, which is a much larger and more competitive environment. This focus has allowed them to develop a wide range of products and services that appeal to a broad range of consumers.

Form 9723-0228 (Instructions only) Only file.

TABLE 1

[illegible]

© 2004 Pearson Education, Inc. All rights reserved. This publication is protected by copyright. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or by any information storage or retrieval system, without permission in writing from Pearson Education, Inc.

PLT/16803342

Group 10, (class) 1077, 1078, 1079, 1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1088, 1089, 1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096, 1097, 1098, 1099, 1100, 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109, 1110, 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1118, 1119, 1120, 1121, 1122, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1128, 1129, 1130, 1131, 1132, 1133, 1134, 1135, 1136, 1137, 1138, 1139, 1140, 1141, 1142, 1143, 1144, 1145, 1146, 1147, 1148, 1149, 1150, 1151, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1158, 1159, 1160, 1161, 1162, 1163, 1164, 1165, 1166, 1167, 1168, 1169, 1170, 1171, 1172, 1173, 1174, 1175, 1176, 1177, 1178, 1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1191, 1192, 1193, 1194, 1195, 1196, 1197, 1198, 1199, 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216, 1217, 1218, 1219, 1220, 1221, 1222, 1223, 1224, 1225, 1226, 1227, 1228, 1229, 1230, 1231, 1232, 1233, 1234, 1235, 1236, 1237, 1238, 1239, 1240, 1241, 1242, 1243, 1244, 1245, 1246, 1247, 1248, 1249, 1250, 1251, 1252, 1253, 1254, 1255, 1256, 1257, 1258, 1259, 1260, 1261, 1262, 1263, 1264, 1265, 1266, 1267, 1268, 1269, 1270, 1271, 1272, 1273, 1274, 1275, 1276, 1277, 1278, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283, 1284, 1285, 1286, 1287, 1288, 1289, 1290, 1291, 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298, 1299, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 1312, 1313, 1314, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335, 1336, 1337, 1338, 1339, 1340, 1341, 1342, 1343, 1344, 1345, 1346, 1347, 1348, 1349, 1350, 1351, 1352, 1353, 1354, 1355, 1356, 1357, 1358, 1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1364, 1365, 1366, 1367, 1368, 1369, 1370, 1371, 1372, 1373, 1374, 1375, 1376, 1377, 1378, 1379, 1380, 1381, 1382, 1383, 1384, 1385, 1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409, 1410, 1411, 1412, 1413, 1414, 1415, 1416, 1417, 1418, 1419, 1420, 1421, 1422, 1423, 1424, 1425, 1426, 1427, 1428, 1429, 1430, 1431, 1432, 1433, 1434, 1435, 1436, 1437, 1438, 1439, 1440, 1441, 1442, 1443, 1444, 1445, 1446, 1447, 1448, 1449, 1450, 1451, 1452, 1453, 1454, 1455, 1456, 1457, 1458, 1459, 1460, 1461, 1462, 1463, 1464, 1465, 1466, 1467, 1468, 1469, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1475, 1476, 1477, 1478, 1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484, 1485, 1486, 1487, 1488, 1489, 1490, 1491, 1492, 1493, 1494, 1495, 1496, 1497, 1498, 1499, 1500, 1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514, 1515, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1523, 1524, 1525, 1526, 1527, 1528, 1529, 1530, 1531, 1532, 1533, 1534, 1535, 1536, 1537, 1538, 1539, 1540, 1541, 1542, 1543, 1544, 1545, 1546, 1547, 1548, 1549, 1550, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1565, 1566, 1567, 1568, 1569, 1570, 1571, 1572, 1573, 1574, 1575, 1576, 1577, 1578, 1579, 1580, 1581, 1582, 1583, 1584, 1585, 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1591, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, 1606, 1607, 1608, 1609, 1610, 1611, 1612, 1613, 1614, 1615, 1616, 1617, 1618, 1619, 1620, 1621, 1622, 1623, 1624, 1625, 1626, 1627, 1628, 1629, 1630, 1631, 1632, 1633, 1634, 1635, 1636, 1637, 1638, 1639, 1640, 1641, 1642, 1643, 1644, 1645, 1646, 1647, 1648, 1649, 1650, 1651, 1652, 1653, 1654, 1655, 1656, 1657, 1658, 1659, 1660, 1661, 1662, 1663, 1664, 1665, 1666, 1667, 1668, 1669, 1670, 1671, 1672, 1673, 1674, 1675, 1676, 1677, 1678, 1679, 1680, 1681, 1682, 1683, 1684, 1685, 1686, 1687, 1688, 1689, 1690, 1691, 1692, 1693, 1694, 1695, 1696, 1697, 1698, 1699, 1700, 1701, 1702, 1703, 1704, 1705, 1706, 1707, 1708, 1709, 1710, 1711, 1712, 1713, 1714, 1715, 1716, 1717, 1718, 1719, 1720, 1721, 1722, 1723, 1724, 1725, 1726, 1727, 1728, 1729, 1730, 1731, 1732, 1733, 1734, 1735, 1736, 1737, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742, 1743, 1744, 1745, 1746, 1747, 1748, 1749, 1750, 1751, 1752, 1753, 1754, 1755, 1756, 1757,

(299)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

ターマコード (参考)

A 61 K 48/06	A 61 P 43/06	1 0 5
A 61 P 35/00	C 07 K 7/06	
A 61 P 43/00	C 07 K 14/035	
C 07 K 7/06	C 07 K 14/16	
C 07 K 14/035	C 07 K 14/225	
C 07 K 14/16	C 07 K 14/50	
C 07 K 14/225	C 07 K 19/00	
C 07 K 14/50	C 12 N 1/21	
C 07 K 19/00	A 61 K 37/48	
C 12 N 1/21	A 61 K 37/02	

(81)指定国

AP(CH,CH,KE,LS,MH,MZ,SD,SL,S2,T2,UG,ZW), EA(AM,AZ,BY,BG,KZ,MD,RU,T3,TM), EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE), OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GM,HR,NE,SN,TD,TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GI, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, UK, LR, LS, LT, LU, LV, NA, ND, NG, HK, NN, MW, NK, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 バームデス、デヴィッド、ジー。

アメリカ合衆国 06492 コネティカット州、ウォーリングフォード、ノース メイン ストリート 524

(72)発明者 キング、イヴァン、シー。

アメリカ合衆国 06473 コネティカット州、ニュー ヘブーン、ブルー ヒルズ ロード 65

(72)発明者 クレアモント、キャロライン、エー。

アメリカ合衆国 06410 コネティカット州、チェシャー、マウウィン サークル 80

(72)発明者 リン、スタンレー、エル。

アメリカ合衆国 06443 コネティカット州、マディソン、オールド トール ロード 173

(72)発明者 ベルコート、マイケル

アメリカ合衆国 06942 コネティカット州、ウォーリングフォード、アルゴンキン ドライブ 9

Fターム (参考) 4B024 AA01 BA28 BA30 CA04 DA05 HA17

4B055 AA46X AB01 CA24 CA31 CA44

AC084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA03 CA53 EC02 DC22 DC50

HA02 NA14 ZB212 ZB262

AC087 AA01 AA02 AA03 BC35 CA09 NA02 NA14 ZB21 ZB26

4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 DA01 DA14 DA83 DA89 EA20 FA74